



Modifications post-traductionnelles de la VE-cadhérine : des mécanismes moléculaires aux applications cliniques

Adama Sidibe

► To cite this version:

Adama Sidibe. Modifications post-traductionnelles de la VE-cadhérine : des mécanismes moléculaires aux applications cliniques. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GREN051 . tel-00819876

HAL Id: tel-00819876

<https://theses.hal.science/tel-00819876>

Submitted on 2 May 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Adama SIDIBE

Thèse dirigée par **Isabelle VILGRAIN**

préparée au sein du **Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Modifications post-traductionnelles de la VE-cadhérine : des mécanismes moléculaires aux applications cliniques

Thèse soutenue publiquement le « **14 Décembre 2012** »,
devant le jury composé de :

Mme, Annie, ANDRIEUX

Directeur de recherche INSERM U836, Grenoble

Président

Mr, Olivier, VITTECOQ

Professeur, Université de Rouen, Rouen

Rapporteur

Mr, Gilles, PAGES

Directeur de recherche CNRS UMR 6543, Nice

Rapporteur

Mme, Ewa, Ninio

Directeur de recherche INSERM UMRS937

Examineur

Mr, Olivier, CHABRE

Professeur, CHU de Grenoble, Grenoble

Examineur

Mme, Isabelle, VILGRAIN

Directeur de recherche INSERM U1036

Directrice de thèse



Remerciements

Cette thèse est l'aboutissement de plusieurs années de travail rendu possible grâce aux soutiens de nombreuses personnes physiques et morales sans lesquelles, elle n'aurait pas pu avoir lieu.

Tout d'abord je remercie la Fondation Arthritis Courtin d'avoir financé mes trois années de doctorat.

Je remercie le Professeur Olivier Vittecoq et le Docteur Gilles Pages d'être les rapporteurs de ce travail. De même je remercie Docteur Ewa Ninio, Professeur Olivier Chabre et Docteur Annie Andrieux pour leur participation dans mon jury de thèse.

Je remercie ma directrice de thèse Dr Isabelle Vilgrain pour sa confiance et son aide précieuse tout au long de mon expérience professionnelle, surtout pendant l'écriture de mes articles et de ce manuscrit de thèse. Ces années de stages (L3, M1 et M2) et de thèse passées sous la direction d'Isabelle Vilgrain ont été une grande expérience professionnelle et personnelle. Je la remercie de sa disponibilité et de sa bienveillance.

Je remercie Dr Philippe Huber de m'avoir accepté dans son ancien laboratoire Angiogénèse et physiopathologies vasculaires pour y effectuer mes stages et de commencer ma thèse. Je remercie Dr Jean Jacques Feige d'avoir accepté que je continue ma thèse au sein de son laboratoire et pour son attention face à l'avenir professionnel de ses étudiants en thèse.

Je remercie Dr Danielle Gulino pour sa disponibilité, sa gentillesse en mon égard et ses conseils. Ce fut une très grande chance pour moi de connaître Pr Laurence Bouillet que je remercie énormément pour sa disponibilité et surtout pour toutes ces consultations rapides qu'elle a pu me trouver chez ses confrères.

Un grand merci aux autres membres de l'équipe JEA notamment Marie, Abbas, Michel, Helena et les stagiaires que j'ai connus au cours de cette thèse : Jeremy, Julie, Laurie, Fatima, Raphaël, Morgane et victoria. Je remercie les anciens membres de l'ancien laboratoire LAPV dont Francine, Josiane et l'ancienne secrétaire Christine Lefebvre. Je remercie mes anciens collègues étudiants avec lesquels j'ai passé de bons moments (Adeline, Alice, Tiphaine, Mélanie, Sandra, Stéphanie, Antoine, Jane et Mariela).

J'aimerais également remercier tous mes amis maliens au Mali comme en France, particulièrement Mamadou Toungara et Fassely Doumbia pour tous les bons moments et de soutiens mutuels loin de nos parents. Je les remercie pour leur amitié sincère.

Je ne saurais terminer ces reconnaissances sans remercier Audrey Ciccarelli pour son amour, son soutien indéfectible qu'elle m'a témoigné et qu'elle continue à faire. Je la remercie pour la relecture de mon manuscrit. Je remercie également sa mère Corine Barone pour sa gentillesse ainsi que toute sa famille et amis qui sont devenus une famille et des amis pour moi. Une grande pensée pour sa Mamie qui nous a quittés mais de qui je garde de très bons souvenirs.

Enfin, je remercie mes chers parents qui n'ont jamais fait économie de soutien ou d'encouragement dans mes entreprises. Je remercie énormément mon père Moussa Sidibé pour sa présence constante et pour avoir assuré le « voyage » quotidien entre Kati et le Lycée Prosper Kamara pendant trois ans. Ce n'était pas évident ! Encore Merci pour tout papa. Je remercie ma mère Haby Soumaré pour avoir toujours été là pour moi et mes frères et sœurs. Son instruction et son assistance m'ont été d'une grande aide pendant les premiers moments de ma scolarité. Je remercie mes frères, sœurs, cousins, cousines, oncles, tantes et grands-parents des familles Sidibé et Soumaré pour tout.

A toute ma famille, particulièrement

Mon père Moussa Sidibé,

Ma mère Haby Soumaré,

Mes frères et sœurs

Table des matières

PREAMBULE	9
PARTIE I: INTRODUCTION SUR L'ENDOTHELIUM DES VAISSEAUX SANGUINS ET LE MAINTIEN DE SON INTEGRITE EN PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE	13
CHAPITRE I: SYSTEMES CARDIOVASCULAIRE ET LYMPHATIQUE	15
<i>I.1 Introduction.....</i>	<i>15</i>
<i>I.2 Système Cardiovasculaire.....</i>	<i>16</i>
I.2.1 Circuits vasculaires.....	16
I.2.1.1 Circulation pulmonaire	16
I.2.1.2 Circulation systémique	16
I.2.2 Appareil circulatoire.....	16
I.2.2.1 Le cœur.....	16
I.2.2.2 Vaisseaux sanguins.....	21
<i>I.3 Système vasculaire lymphatique</i>	<i>28</i>
I.3.1 Vaisseaux lymphatiques	29
I.3.1.1 Structure des vaisseaux lymphatiques.....	29
I.3.1.2 Fonction des vaisseaux lymphatiques	29
I.3.1.3 Régulation des fonctions des vaisseaux lymphatiques	29
I.3.2 Ganglions lymphatiques	30
I.3.2.1 Structure d'un ganglion lymphatique.....	30
I.3.2.2 Fonction des ganglions lymphatiques	30
<i>I.4 Exemples de dysfonctions cardiovasculaires</i>	<i>31</i>
I.4.1 Hypertension	31
I.4.2 Athérosclérose	32
I.4.3 Œdème.....	33
<i>I.5 Conclusion</i>	<i>33</i>
CHAPITRE II: ENDOTHELIUM VASCULAIRE ET HOMEOSTASIE DES VAISSEAUX.....	34
<i>II.1 Introduction</i>	<i>34</i>
<i>II.2 Formation de l'endothélium et développement vasculaire</i>	<i>35</i>
II.2.1 Vasculogenèse.....	35
II.2.2 Angiogenèse.....	37
II.2.2.1 Bourgeonnement endothélial.....	37
II.2.2.2 Intussusception des vaisseaux.....	42
II.2.3 Différenciation artérioveineuse	44
II.2.3.1 Notch et la différenciation des artères	45
II.2.3.2 Ephrin-B2 et EphB4	45
II.2.3.3 Neuropiline (NRP) :	45
II.2.4 Néovascularisation chez l'adulte	46
II.2.4.1 Angiogenèse physiologique chez l'adulte	46

II.2.4.2 Angiogenèse pathologique	47
<i>II.3 Endothélium et modulation de la perméabilité vasculaire</i>	48
II.3.1 Perméabilité basale.....	49
II.3.2 Perméabilité induite.....	50
II.3.3 Agents influençant la perméabilité	51
II.3.3.1 Inducteurs de perméabilité.....	51
II.3.3.2 Stabilisateurs de la barrière endothéliale	55
<i>II.4 Régulation du trafic des leucocytes par l'endothélium</i>	56
II.4.1 Extravasation leucocytaire dans les veinules post-capillaires.....	57
II.4.1.1 Roulement des leucocytes	57
II.4.1.2 Activation et arrêt au site inflammatoire :	57
II.4.1.3 Transmigration leucocytaire :	58
II.4.1.4 Passage de la membrane basale et des péricytes.....	58
II.4.2 Extravasation dans d'autres vaisseaux	59
II.4.2.1 Dans les capillaires	59
II.4.2.2 Dans les artères et artérioles	59
II.4.2.3 Dans les veinules à haut endothélium.....	59
<i>II.5 Endothélium et vasomotricité</i>	61
<i>II.6 Conclusion</i>	62
CHAPITRE III: INTEGRITE ET COHESION DE L'ENDOTHELIUM	63
<i>III.1 Généralité sur les jonctions endothéliales</i>	63
<i>III.2 Les jonctions endothéliales</i>	64
III.2.1 Jonctions serrées	64
III.2.1.1 Définition	64
III.2.1.2 Composition protéique	65
III.2.2 Jonctions adhérentes	69
III.2.2.1 Définition	69
III.2.2.2 Cadhérines endothéliales.....	70
III.2.2.3 Caténines.....	73
III.2.2.4 Kinases et phosphatases des jonctions adhérentes.....	77
<i>III.3 Rôle de la VE-cadhérine dans la fonction et l'intégrité de l'endothélium</i>	82
III.3.1 VE-cadhérine dans l'angiogenèse	82
III.3.2 Inhibition de la prolifération cellulaire.....	83
III.3.3 VE-cadhérine et survie cellulaire induite par le VEGF	86
III.3.4 VE-cadhérine et force hémodynamique.....	86
III.3.5 Contrôle des jonctions serrées.....	86
III.3.6 Modulation de la force des jonctions intercellulaires par la VE-cadhérine	87
III.3.6.1 Phosphorylation du complexe de VE-cadhérine.....	88
III.3.6.2 Internalisation de la VE-cadhérine	93
III.3.6.3 Clivage de la VE-cadhérine.....	93
<i>III.4 Conclusion</i>	94
CHAPITRE IV: PATHOLOGIES VASCULAIRES ASSOCIEES A UN DYSFONCTIONNEMENT ENDOTHELIAL.....	96
<i>IV.1 Introduction</i>	96

<i>IV.2 Exemple d'une maladie inflammatoire : la polyarthrite rhumatoïde (PR)</i>	97
IV.2.1 Généralité sur la PR	97
IV.2.2 Physiopathologie de la PR	97
IV.2.2.1 Phase d'initiation	98
IV.2.2.2 Infiltration des lymphocytes.....	98
IV.2.2.3 Formation du pannus.....	99
IV.2.3 Syndromes associés à la PR.....	99
IV.2.4 Implication de l'endothélium dans la PR et l'athérosclérose associée	100
IV.2.4.1 Endothélium et recrutement leucocytaire dans la PR.....	100
IV.2.4.2 Cellules endothéliales et croissance du pannus	100
IV.2.4.3 Endothélium et athérosclérose dans la PR	100
IV.2.5 Diagnostic de la PR	101
IV.2.5.1 Diagnostic macromorphologique	101
IV.2.5.2 Analyses biologiques	101
IV.2.5.3 Examens radiologiques	102
IV.2.6 Traitements de la PR et évaluation de la réponse.....	102
IV.2.6.1 Objectifs thérapeutiques.....	102
IV.2.6.2 Traitements	104
IV.2.6.3 Evaluation de l'efficacité thérapeutique.....	107
IV.2.7 Modèles d'étude de la PR chez la souris.....	108
IV.2.7.1 Modèle CIA	108
IV.2.7.2 Modèle CAIA	109
IV.2.7.3 Evaluation de l'arthrite induite chez la souris	109
IV.2.8 Conclusion :	109
<i>IV.3 Syndrome d'hyperstimulation ovarienne :</i>	110
IV.3.1 Généralité sur l'OHSS	110
IV.3.2 Mécanismes	111
<i>IV.4 Dysfonction endothéliale et autres pathologies</i>	111
IV.4.1 Les ischémies.....	111
IV.4.2 Les maladies inflammatoires à tropisme pulmonaire.....	112
IV.4.3 Pathologies oculaires	112
<i>IV.5 Conclusion</i>	112

PARTIE II: CONTRIBUTION DE LA THESE AUX MODIFICATIONS DE LA VE-CADHERINE ET LEURS INTERETS *IN VITRO* ET *IN VIVO* 115

CHAPITRE I: PHOSPHORYLATION ET CLIVAGE DE LA VE-CADHERINE SOUS L'ACTION DU $TNF\alpha$: IMPLICATIONS DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE	117
I.1 Contexte scientifique.....	117
I.2 Objectifs des travaux de recherche	118
I.3 Principaux résultats.....	118
I.4 Article 1: Soluble VE-Cadherin in Rheumatoid Arthritis Patients Correlates With Disease Activity ..	121
I.5 Supplemental data.....	134
I.5.1 Supplemental methods.....	134

1.5.2 Supplemental references.....	135
1.5.3 Legends for supplemental figures.....	135
1.5.4 Supplemental figures.....	137
1.6 Discussion et perspectives de l'article 1.....	141
CHAPITRE II: IMPLICATION DE LA PHOSPHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE EN PHYSIOLOGIE ET PATHOLOGIE.....	143
II.1 Contexte scientifique.....	143
II.2 Objectifs des travaux de recherche.....	143
II.3 Principaux résultats.....	144
II.4 Article 2 : Mouse estrous cycle is a physiological regulator of VE-cadherin phosphorylation in vivo: Analysis of VE-Y685F knock-in mice.....	147
II.5 Discussion et perspectives de l'article 2.....	189
II.6 Autres caractéristiques des souris VE-Y685F.....	192
II.6.1 Etudes sur le rein.....	192
II.6.2 Autres caractéristiques.....	193
II.6.3 La PR chez les souris VE-Y685F.....	194
II.6.4 VE-cadhérine soluble.....	198
DISCUSSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES DE LA THESE.....	199
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :.....	205

Préambule

L'endothélium vasculaire est la monocouche de cellules endothéliales qui tapisse l'intérieur des vaisseaux sanguins. Il est en contact direct avec le sang et joue un rôle fondamental dans la physiologie des vaisseaux sanguins. Il est à l'origine de la formation de nouveaux vaisseaux, permet le passage sélectif de nutriments, de gaz, de biomolécules et de cellules immunitaires entre la circulation sanguine et le tissu environnant. Cette perméabilité sélective aux molécules ou encore aux cellules immunitaires est possible grâce à une régulation précise de l'écartement des cellules endothéliales entre elles, directement contrôlée par des structures composées de molécules d'adhérence. Parmi ces structures, la jonction adhérente, dont le composant moléculaire central est la cadhérine classique spécifique de l'endothélium vasculaire (VE-cadhérine), occupe une place importante dans le contrôle de la perméabilité vasculaire. Bien que les cellules endothéliales expriment d'autres cadhérines, la VE-cadhérine est la principale molécule localisée aux jonctions adhérentes et assure l'intégrité de l'endothélium vasculaire. L'implication de la VE-cadhérine a été montrée dans de nombreux processus dont l'angiogenèse ou la modulation de la perméabilité vasculaire *in vitro* comme *in vivo* (Dejana, Orsenigo et al. 2008).

La fonction adhésive de la VE-cadhérine est régulée par différentes modifications de la protéine dont la phosphorylation de son domaine cytoplasmique sur sérine ou sur tyrosine et le clivage de son domaine extracellulaire par des protéases. Des facteurs angiogéniques et inflammatoires tels que le VEGF et le TNF α induisent la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine, un processus corrélé avec une augmentation de la perméabilité endothéliale. Ces facteurs ont une importance capitale dans le développement de maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde (PR). Mais l'effet de ces facteurs sur le clivage de la molécule est très peu investigué.

La première investigation de la phosphorylation de la VE-cadhérine *in vivo* a été faite au laboratoire (Lambeng, Wallez et al. 2005). Cela a permis de savoir que la VE-cadhérine est phosphorylée sur tyrosine dans l'ovaire et l'utérus de souris traitées avec PMSG/hCG hormones qui induisent la maturation ovarienne. Cependant les sites de cette phosphorylation de la VE-cadhérine sont peu connus. De plus il a été montré au laboratoire que le VEGF induit la phosphorylation de la VE-cadhérine préférentiellement sur la tyrosine Y685 par l'intermédiaire de la kinase Src (Wallez, Cand et al. 2007).

Mon travail de thèse a consisté en deux projets reliés qui ont été menés en parallèle. Le premier projet a été sur l'étude des mécanismes de clivage de la VE-cadhérine sous l'action des cytokines angiogéniques et inflammatoires. J'ai pu examiner le lien entre le processus de phosphorylation de la molécule et celui de son clivage sous l'action du TNF α . J'ai aussi étudié l'intérêt potentiel du fragment extracellulaire de la VE-cadhérine, appelé VE-cadhérine soluble, en application clinique en analysant le niveau de ce fragment dans les sérums de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et en le comparant à d'autres paramètres biologiques. Le deuxième projet a été d'étudier la phosphorylation de la VE-cadhérine *in vivo*. Le site de phosphorylation de la VE-cadhérine a pu être examiné dans l'ovaire et l'utérus de souris C57Bl/6 stimulées avec les hormones PMSG/hCG. Les résultats obtenus chez ces

animaux stimulés avec les hormones ont conduit à l'analyse de la phosphorylation de la VE-cadhérine dans l'ovaire et l'utérus de souris au cours du cycle ovarien, afin de savoir si cette phosphorylation était soumise à une modulation de son niveau de façon endogène. J'ai pu par la suite étudier la phosphorylation de la VE-cadhérine spécifiquement sur Y685 dans ce même contexte. Pour avoir une idée de l'implication de la phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine *in vivo*, nous avons analysé le phénotype de souris transgéniques knock-in portant la mutation de la tyrosine Y685 de la VE-cadhérine en phénylalanine (VE-Y685F). L'utilisation de modèles d'arthrite induite chez la souris a permis d'évaluer l'importance de la phosphorylation de la tyrosine Y685 dans les phases précoces et relativement tardives de l'arthrite induite chez la souris.

Une partie des résultats obtenus au cours de cette thèse a fait l'objet d'une publication scientifique dans la revue « Arthritis and Rheumatism » pour ce qui concerne le clivage de la VE-cadhérine et l'intérêt potentiel du fragment soluble de la protéine en pratique clinique. Cette publication s'est poursuivie par une demande de brevetabilité par INSERM-TRANSFERT aux Etats Unis pour une méthode de prise en charge thérapeutique des patients atteints de PR. Certains résultats de la thèse sur la phosphorylation de la VE-cadhérine *in vivo* sont en cours de soumission à la revue « Journal of Experimental Medicine ». La plupart des résultats de ma thèse ont été présentés dans ce manuscrit qui comporte deux grandes parties composées de 7 chapitres en tout.

La première partie (Partie I), constituée des chapitres I à IV, présente un certain nombre de généralités sur la fonction du système vasculaire et l'importance de l'endothélium vasculaire. Dans cette partie est aussi exposé un état de l'art des connaissances sur les modifications de la VE-cadhérine dans la physiologie et la physiopathologie vasculaire.

La partie II de ce manuscrit comporte la contribution de cette thèse à la compréhension des mécanismes de clivage de la VE-cadhérine et son intérêt potentiel dans la prise en charge des malades polyarthritiques (chapitre V). Dans le chapitre VI sont présentés mes travaux sur la phosphorylation de la VE-cadhérine *in vivo*, sa régulation au cours du cycle œstral chez la souris et particulièrement les premiers résultats du phénotypage des souris transgéniques VE-Y685F. La partie II se termine par le chapitre VII qui comporte une discussions générales et des perspectives de la thèse dans lequel j'expose l'intérêt de ce travail ainsi que différentes investigations que je trouve intéressantes à faire pour une meilleure compréhension du rôle et de l'intérêt des modifications de la VE-cadhérine *in vivo* en physiologie et physiopathologie vasculaire.

**Partie I: Introduction sur
l'endothélium des vaisseaux san-
guins et le maintien de son inté-
grité en physiologie et
physiopathologie**

Chapitre I: Systèmes cardiovasculaire et lymphatique

Sommaire

CHAPITRE I: SYSTEMES CARDIOVASCULAIRE ET LYMPHATIQUE	15
1.1 Introduction.....	15
1.2 Système Cardiovasculaire.....	16
1.2.1 Circuits vasculaires.....	16
1.2.2 Appareil circulatoire.....	16
1.3 Système vasculaire lymphatique	28
1.3.1 Vaisseaux lymphatiques	29
1.3.2 Ganglions lymphatiques	30
1.4 Exemples de dysfonctions cardiovasculaires	31
1.4.1 Hypertension	31
1.4.2 Athérosclérose	32
1.4.3 Œdème.....	33
1.5 Conclusion	33

I.1 Introduction

Toute cellule, tout tissu, tout organe ou tout système au sein d'un organisme vivant a besoin d'être approvisionné en nutriments et en oxygène pour le maintien de ses fonctionnalités physiologiques. Chez les vertébrés, les systèmes cardiovasculaire et lymphatique irriguent toutes les parties de l'organisme afin de permettre l'approvisionnement en nutriments, l'échange de gaz avec l'extérieur, l'élimination des déchets et la défense contre tout corps étranger.

Le cœur et les vaisseaux sanguins constituent le système cardiovasculaire. Propulsé par le cœur, le sang circule dans tout l'organisme à travers un vaste réseau de vaisseaux sanguins. Comme il est illustré sur la Figure I.1, les vaisseaux sanguins se répartissent en deux circuits distincts : la circulation pulmonaire et la circulation systémique.

Le système lymphatique, fortement lié au réseau vasculaire sanguin, a pour rôle de drainer le surplus de fluides tissulaires et participe à la défense immunitaire contre les corps étrangers tels que les virus et les bactéries.

Ce chapitre du manuscrit a pour but de mettre en exergue l'importance du système cardiovasculaire pour la physiologie de l'organisme afin de mieux cerner son implication dans les processus physiologiques ou physiopathologiques décrits dans les chapitres suivants. Dans ce chapitre nous allons donc analyser synthétiquement la circulation sanguine dans laquelle nous verrons brièvement les compo-

sants de l'appareil circulatoire (le cœur et les différents types de vaisseaux sanguins) et par finir la structure et les fonctions majeures du système lymphatique seront évoquées.

I.2 Système Cardiovasculaire

I.2.1 Circuits vasculaires

Le sang circule de façon continue à travers deux voies principales de circulation qui sont les circuits pulmonaire et systémique (Figure I.1).

I.2.1.1 Circulation pulmonaire

La circulation pulmonaire est constituée du ventricule droit qui éjecte le sang, des artères pulmonaires qui conduisent le sang pauvre en oxygène aux poumons, des capillaires pulmonaires qui assurent l'échange de gaz, des veines pulmonaires qui transportent le sang nouvellement riche en oxygène au cœur et enfin l'oreillette gauche qui reçoit le sang des veines pulmonaires et permet son transfert vers le circuit systémique. Ainsi le circuit sanguin pulmonaire est constitué de structures cardiaques et d'un ensemble de vaisseaux sanguins qui permettent les échanges gazeux entre le sang et l'air contenu dans les poumons.

I.2.1.2 Circulation systémique

La circulation systémique implique tous les vaisseaux du corps ne faisant pas partie du réseau pulmonaire. Il est constitué du ventricule gauche qui propulse le sang, l'aorte et ses branches qui conduisent le sang vers les tissus périphériques, de tous les capillaires non pulmonaires qui assurent les échanges effectifs, des veines non pulmonaires qui assurent le retour du sang pauvre en oxygène au cœur et enfin de l'oreillette droite qui reçoit le sang des veines et permet son transfert dans la circulation pulmonaire. En tout, la circulation systémique assure l'irrigation sanguine de tous les organes et tissus périphériques sauf les poumons.

I.2.2 Appareil circulatoire

L'appareil circulatoire est constitué du cœur et des réseaux vasculaires pulmonaires et systémiques qui en somme forment un circuit fermé.

I.2.2.1 Le cœur

Le cœur est un organe musculaire et creux, situé dans le thorax, qui a pour rôle entre autres de propulser le sang vers les tissus à travers les réseaux vasculaires pulmonaires et systémiques. Le rôle moteur du cœur permet ainsi de :

- garder le sang pauvre en oxygène séparément de celui riche en oxygène,

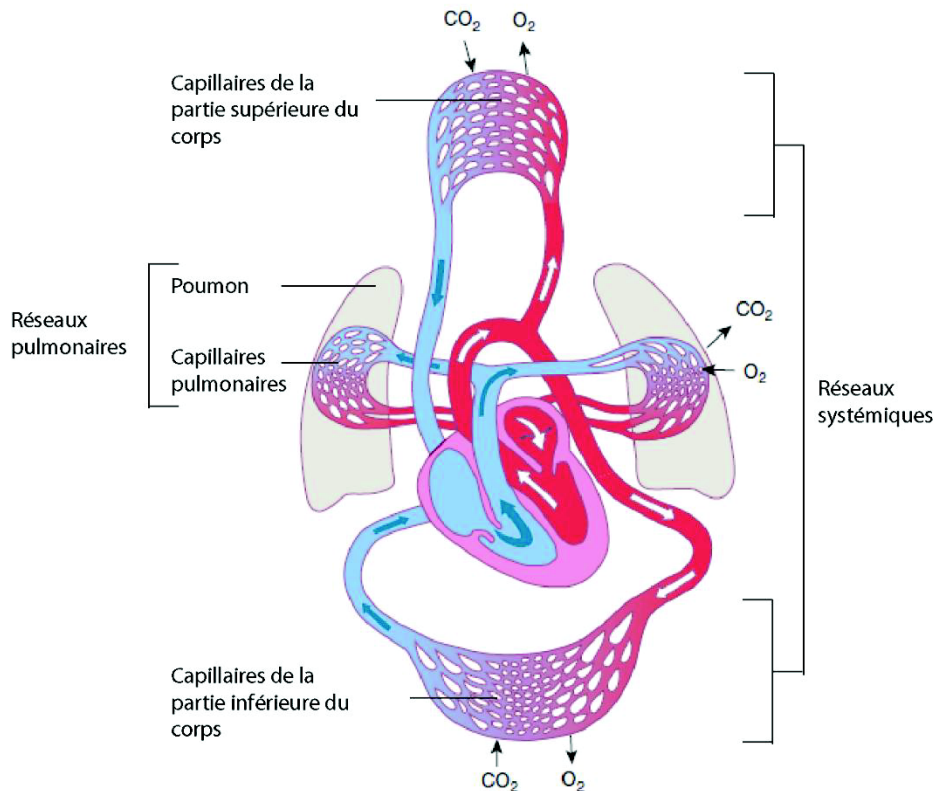


Figure I.1: Le système cardiovasculaire montrant les réseaux vasculaires pulmonaires et systémiques (Modifiée de (Mader 2006))

- créer la pression sanguine pour propulser le sang dans les réseaux vasculaires
- maintenir le sens de circulation du sang (flux sanguin)
- réguler l'approvisionnement des tissus en sang selon leur besoin

I.2.2.1.1. Anatomie et structures

De la taille d'un point fermé, le cœur est constitué de différentes couches de tissus conjonctifs, musculaires et endothéliaux (Figure I.2) qui s'organisent et délimitent quatre cavités que sont les oreillettes et les ventricules.

1a. Structure de la paroi cardiaque

Le péricarde est une structure formée par deux couches denses de tissus conjonctifs qui sont séparées par une cavité péricardique. Une des couches du péricarde, l'épicaire contenant les vaisseaux coronaires, est directement accolée au myocarde. Le péricarde enveloppe le cœur et le protège en le séparant des autres organes thoraciques.

Le myocarde, la couche la plus épaisse du cœur, est formé de muscle cardiaque et se trouve à l'origine du rôle de pompe qu'assure le cœur. La contraction et le relâchement du myocarde sont automatiques.

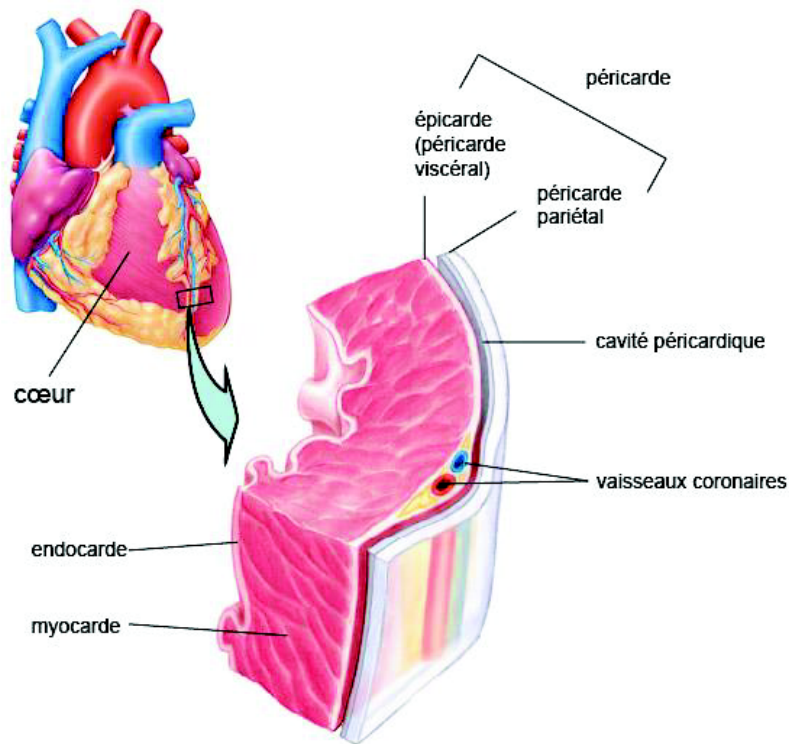


Figure I.2: Structure de la paroi cardiaque. (Modifiée de (Mader 2006))

L'**endocarde** est la monocouche de cellules endothéliales qui tapisse l'intérieur du cœur. Il est en continuité avec l'endothélium vasculaire des artères et veines. Il sert de barrière aux éléments sanguins permettant le maintien de la concentration des solutés dans l'espace interstitiel du myocarde et peut avoir une action régulatrice de la contraction des fibres musculaires du myocarde.

1b. Cavités cardiaques

Le cœur présente quatre chambres creuses (Figure I.3) : deux oreillettes supérieures et deux ventricules inférieurs qui communiquent entre eux et sont reliés aux vaisseaux du corps. Les oreillettes gauche et droite sont séparées par un septum interauriculaire et de la même manière, les ventricules gauche et droit sont séparés par le septum interventriculaire. L'épaisseur du myocarde au niveau des cavités du cœur dépend très fortement de leurs fonctions. Les oreillettes ont un myocarde peu épais et se vident dans les ventricules adjacents tandis que les ventricules ~~sont~~ ~~et~~ sont plus épais et propulsent le sang à travers les artères du corps. En ce sens, le ventricule gauche est beaucoup plus épais que le droit car ce dernier envoie le sang dans la circulation pulmonaire alors que le premier l'envoie vers la circulation systémique.

Des valves sont établies entre l'oreillette et le ventricule d'un même côté, et entre ces cavités et les vaisseaux associés afin d'assurer le passage unidirectionnel du sang.

I.2.2.1.2. *Physiologie du cœur*

La fonction de pompe du cœur se fait grâce aux fibres musculaires spécialisées du myocarde qui stimulent de façon automatique la contraction des oreillettes et des ventricules. Les contractions rythmiques se produisent spontanément. L'oreillette droite et le ventricule droit reçoivent le sang pauvre en oxygène en provenance de tout le corps tandis que l'oreillette gauche et le ventricule gauche reçoivent le sang riche en oxygène provenant des poumons (Figure I.3). Les contractions des oreillettes gauche et droite sont synchrones. La même synchronisation caractérise le fonctionnement des ventricules gauche et droit.

2a. *Rythme cardiaque*

La fréquence cardiaque au repos est de 60 à 80 battements par minute, pour un débit de 4,5 à 5 litres

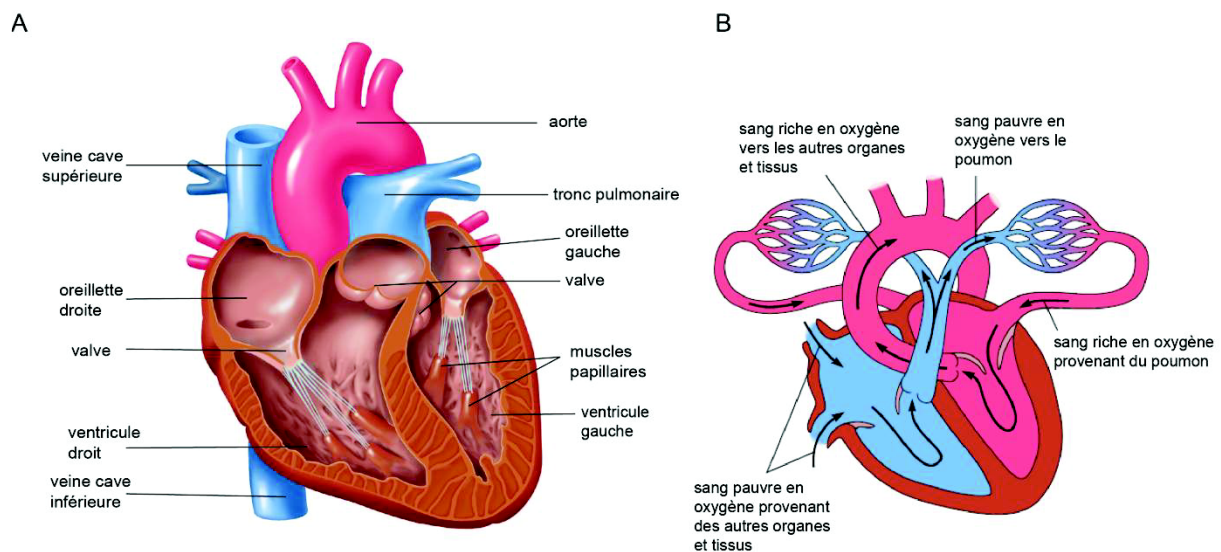


Figure I.3: Cavités cardiaques et le sens de circulation sanguine. A. Les différentes cavités et valves du cœur ; B. Schéma de la circulation intracardiaque. (Modifiée de (Mader 2006))

de sang par minute. Au total, le cœur peut battre plus de 2 milliards de fois en une vie. Chacun de ses battements entraîne une séquence d'événements collectivement appelés la révolution cardiaque. Celle-ci consiste en trois étapes majeures : la systole auriculaire, la systole ventriculaire et la diastole auriculo-ventriculaire (Figure I.4) :

- Au cours de la **systole auriculaire** (0,15 sec), les oreillettes se contractent et éjectent le sang vers les ventricules. Une fois le sang expulsé des oreillettes, les valves auriculo-ventriculaires entre les oreillettes et les ventricules se ferment. Le sang continue tout de même à affluer dans les oreillettes. Ceci évite un reflux du sang vers les oreillettes. Pendant cette phase les ventricules sont en phase de relaxation. La fermeture de ces valves produit le son familier du battement du cœur.

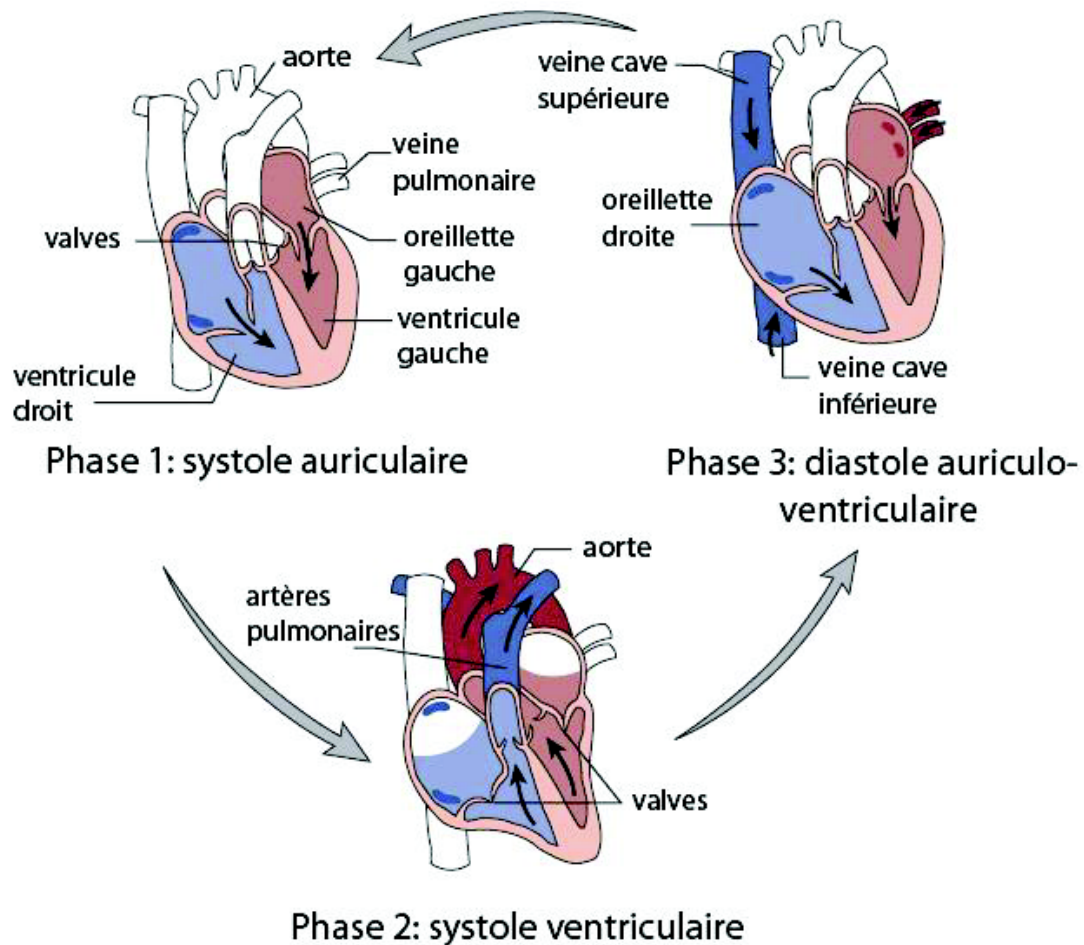


Figure I.4: Les étapes du cycle cardiaque. (Modifiée de (Mader 2006))

- La **systole ventriculaire** (0,30sec) implique la contraction des ventricles, expulsant le sang vers le système circulatoire. En fait, dans un premier temps, très bref, les valvules sigmoïdes sont fermées. Dès que la pression à l'intérieur des ventricles dépasse la pression artérielle, les valvules sigmoïdes s'ouvrent. Une fois le sang expulsé, les deux valves sigmoïdes (la valve pulmonaire à droite et la valve aortique à gauche) se ferment. Ainsi le sang ne reflue pas vers les ventricles. La fermeture des valvules sigmoïdes produit un deuxième bruit cardiaque plus aigu que le premier. La pression sanguine augmente.
- Enfin, la **diastole auriculo-ventriculaire** (0,40 sec) est la relaxation de toutes les parties du cœur, permettant le remplissage (passif) des ventricles, par les oreillettes droite et gauche et depuis les veines caves et pulmonaire. Les oreillettes se remplissent doucement et le sang s'écoule dans les ventricles.

2b. Régulation du rythme cardiaque

2b.a. Régulation par le système nerveux central

La fréquence des contractions cardiaques est modulée par le centre cardio-régulateur et la puissance des contractions, fonction de la pression sanguine, est régulée par le centre vasomoteur (Figure I.5). Ces deux centres appartiennent au système nerveux autonome et sont situés dans le bulbe rachidien. L'activité du centre cardio-régulateur est modulée par des signaux collectés par les barorécepteurs de l'arc aortique et ceux de la carotide.

2b.b. Régulation hormonale

Les hormones telles que l'adrénaline et la noradrénaline (hormones du système adrénergique ou sympathique) ou les hormones thyroïdiennes (T3) favorisent la contractilité. Le système sympathique en plus de son action directe sur le cœur provoque une dilatation des artères coronaires permettant alors une augmentation du débit sanguin dans le muscle cardiaque. Le système sympathique augmente également la fréquence cardiaque.

Ces hormones agissent par l'intermédiaire de récepteurs qui sont de deux types pour le système sympathique : le récepteur alpha et le récepteur bêta. La stimulation des récepteurs alpha peut entraîner l'apparition des troubles du rythme tandis que celle du récepteur bêta conduit à l'accélération du rythme cardiaque, l'augmentation de l'excitabilité et de la contractilité myocardique.

I.2.2.2 Vaisseaux sanguins

Le réseau vasculaire sanguin est composé de trois types de vaisseaux : les artères, les capillaires et les veines (voir Figure I.6). Les vaisseaux ont pour fonction de :

- Transporter le sang et ses constituants (nutriments, gaz, hématies, leucocytes etc)
- Assurer les échanges de gaz dans les capillaires pulmonaires; les échanges de gaz, de nutriments et l'élimination de déchets cellulaires dans les capillaires systémiques
- Réguler la pression sanguine
- Diriger le flux sanguin vers les tissus qui en ont le plus besoin

I.2.2.2.1. Les artères

Les artères transportent le sang du cœur vers les tissus. Il existe deux types d'artères :

Les artères élastiques (diamètre : 1 cm ; épaisseur : 1 mm) ont une composition élevée en tissu élastique. Les principales sont l'aorte, le tronc brachiocéphalique, les artères subclavières, les artères carotides et les artères pulmonaires.

Les artères musculaires (diamètre : 6 mm ; épaisseur : 1 mm) ont une faible composition en tissu élastique mais sont riches en cellules musculaires. Elles sont très nombreuses et retrouvées dans les organes.

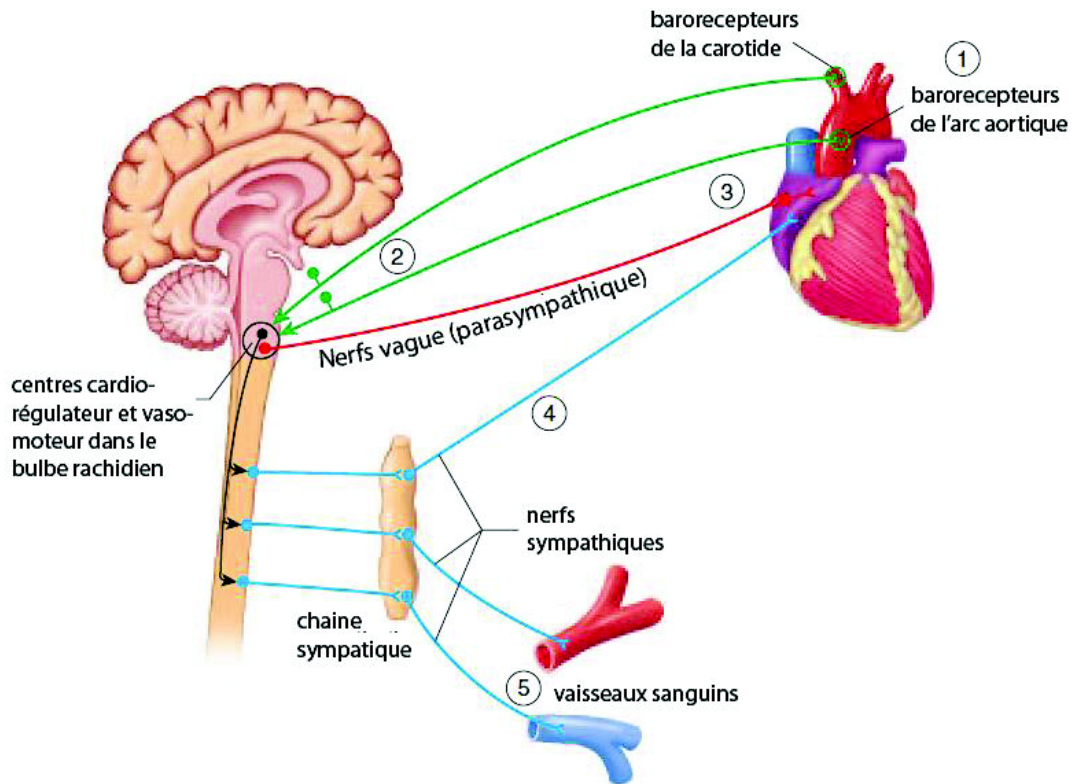


Figure I.5: Régulation nerveuse de l'activité cardiaque. Les barorécepteurs de l'arc aortique et de la carotide reçoivent les informations sur la fréquence cardiaque (1) et les renvoient au centres cardio-régulateur et vasomoteur dans le bulbe rachidien (2); 3. L'influx nerveux parasympathique diminue le battement cardiaque ; 4. L'influx nerveux sympathique augmente le battement cardiaque ; 5. L'influx nerveux sympathique induit la vasoconstriction des vaisseaux sanguins (Modifiée de (Mader 2006))

1a. Anatomie des artères

Elles présentent des parois épaisses composées de trois couches qui sont l'adventice ou *tunica externa*, la media ou *tunica media* et l'intima ou *tunica interna*.

L'adventice est la couche la plus externe et constitue un tissu conjonctif composé principalement de fibroblastes, de fibres élastiques et de fibres de collagène.

La media est la couche intermédiaire très épaisse dans les artères, et est composée de fibres musculaires lisses et élastiques. Elle est séparée des autres couches par une limitante élastique circulaire interne et une limitante élastique longitudinale externe. La media par sa contraction, module la pression sanguine.

L'intima est la plus interne et constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (endothélium) avec une membrane basale. L'endothélium vasculaire est en contact direct avec le sang.

1b. Fonction des artères

Le large diamètre interne des artères leur confère une faible résistance au flux sanguin qui leur permet d'assurer leur premier rôle d'acheminement du sang oxygéné vers les différents organes. Le second rôle majeur des artères, relié à leurs propriétés élastiques, est de servir de « *réservoir de pression* » pour maintenir le flux sanguin même pendant les phases de relâchement des ventricules (diastole). L'artère est le vaisseau sanguin présentant les pressions sanguines les plus élevées de toutes les circulations pulmonaire et systémique (pression sanguine de 100 mmHg). Les artères ne contiennent (à un moment donné) que 15% du sang total. La forte élasticité des artères leur permet de mieux répondre aux fortes pressions systoliques générées par le cœur.

1c. Régulation de la contractilité des artères

La constriction et la dilatation des artères peuvent être influencées par le système nerveux autonome, par les vasoconstricteurs comme l'épinephrine et les vasodilatateurs comme l'acétylcholine

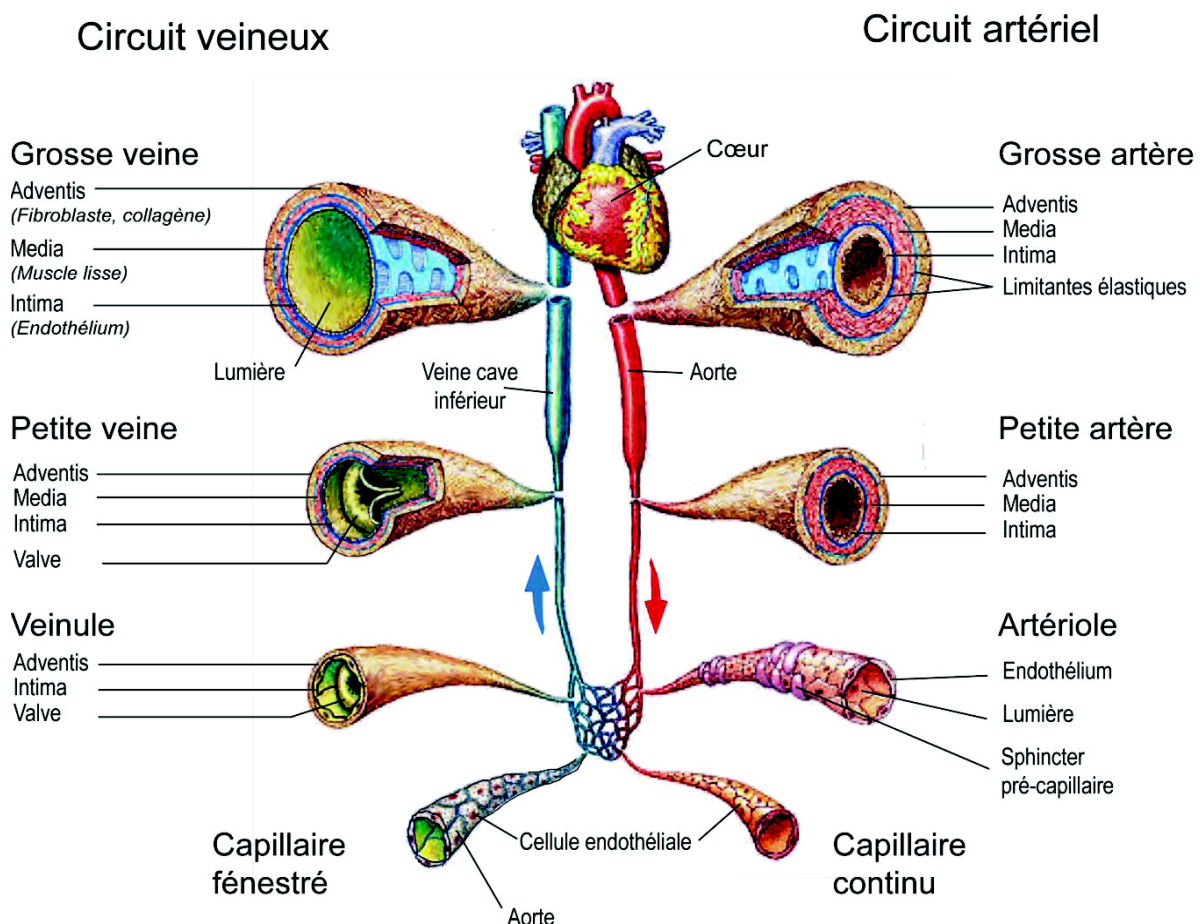


Figure I.6: Composition des vaisseaux des circuits artériels et veineux (modifiée de (Van De Graaff 2001))

I.2.2.2.2. *Les artérioles*

Les artérioles sont des petites artères de 40 à 110 μm de diamètre et d'environ 6 μm d'épaisseur qui se raccordent et se ramifient au départ d'une artère vers des terminaisons artérielles débouchant sur des capillaires.

2a. *Anatomie des artérioles*

Les artérioles ont les mêmes structures anatomiques que les artères avec certaines spécificités. La media des artérioles contient plus de fibres élastiques que les artères mais reste majoritairement composée de muscle lisse. Les artérioles ont de petites parois musculaires.

2b. *Fonction des artérioles*

Les artérioles sont le site primaire de la résistance vasculaire. La contraction et le relâchement des artérioles influencent donc très fortement la distribution et la pression sanguine. La résistance des vaisseaux au flux sanguin est aussi fonction du nombre d'artérioles contractées. De ce fait, les artérioles ont deux rôles majeurs qui sont la régulation du débit sanguin dans les organes selon leurs besoins quelle que soit la pression artérielle et la régulation de la moyenne des pressions artérielles.

2c. *Régulation de la fonction des artérioles*

Le système nerveux autonome et le système endocrinien participent au contrôle de la pression sanguine en régulant le nombre d'artérioles contractées. Néanmoins, les organes par leurs propres sécrétions de médiateurs paracrines, modifient la résistance de leurs réseaux d'artérioles afin d'autoréguler leurs flux sanguin. Ce mécanisme de régulation, appelé *contrôle local* est indépendant des systèmes nerveux et endocrinien.

I.2.2.2.3. *Les capillaires*

Les capillaires relient les veinules aux artérioles et sont des vaisseaux sanguins microscopiques qui font 8-10 μm de diamètre, juste assez large pour laisser passer une hématie. A titre de comparaison un cheveu humain fait 100 μm de diamètre. Les capillaires sont agencés en réseaux arborescents appelés « lits capillaires ». On trouve 2 types de vaisseaux dans un lit :

La dérivation vasculaire est constituée d'une métartériole et d'un canal de passage reliant directement l'artériole et la veinule (Figure I.7) ;

Les capillaires vrais sont les autres vaisseaux du lit capillaire qui sont responsables de l'échange effectif entre le sang et le liquide interstitiel.

3a. *Anatomie des capillaires*

La structure des capillaires varie considérablement d'un organe à un autre. De façon générale, un capillaire est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales interne qui repose sur une fine couche de membrane basale, sans aucune fibre musculaire ou élastique. Néanmoins, les capillaires de nombreux organes sont recouverts d'un autre type de cellules, les péricytes plus ou moins éparses, qui

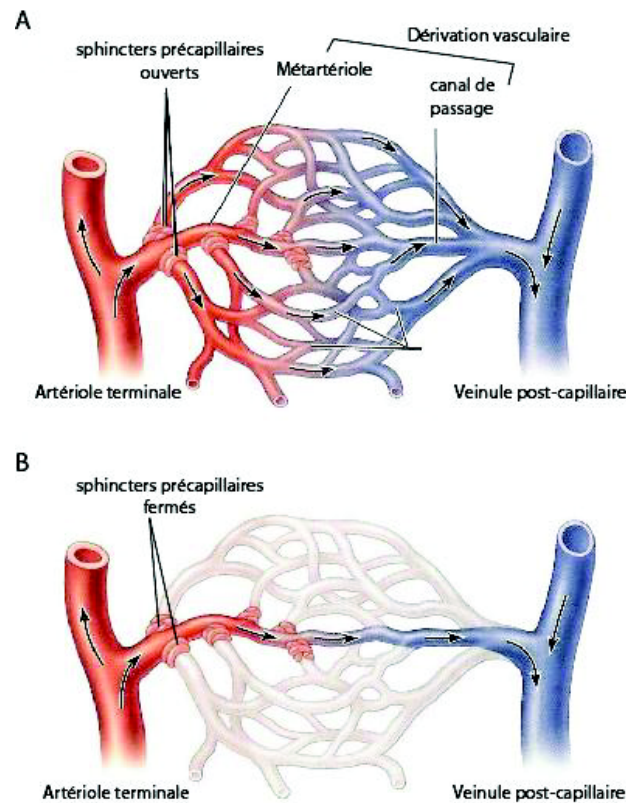


Figure I.7: Lit capillaire. A. Les sphincters précapillaires sont ouverts et laissent le sang passé dans les capillaires ; B. les sphincters précapillaires sont fermés et privilégie le passage du sang à travers la dérivation vasculaire. (Modifiée de (Mader 2006))

assurent leur stabilité et influencent leur perméabilité. Les lits capillaires sont caractérisés par la présence de sphincters précapillaires qui, quand ils sont contractés, laissent le sang s'écouler à travers les métartéριοles et les canaux de passages. Ces sphincters favorisent la circulation sanguine (Figure I.7).

3b. Fonction des capillaires

Environ 5% du sang total passe à travers les capillaires à un temps donné. Ce sont ces 5% de sang qui assure la fonction ultime du système cardiovasculaire qui consiste en l'échange de nutriments, de gaz et de produits finaux du métabolisme. La plupart des cellules de l'organisme se trouve au plus à 100 μm d'un capillaire, ce qui permet un échange très efficace entre l'espace interstitiel et le sang. Un exemple frappant est celui des échanges de gaz au cours desquels le sang est chargé en oxygène dans les réseaux de capillaires pulmonaires, puis passe à travers les artères et les artérioles vers les capillaires des tissus périphériques pour leur apporter l'oxygène. De la même façon, les capillaires collectent le dioxyde de carbone tissulaire qui est véhiculé par le sang à travers les veines et les veinules vers les capillaires pulmonaires pour être évacué en dehors de l'organisme.

3c. Les types de capillaires

Les lits capillaires, réseaux denses et anastomosés de capillaires, ont des perméabilités basales différentes selon les organes, ainsi dans un organe comme le cerveau, les lits capillaires vont présenter une très faible perméabilité (existence d'une barrière hématoencéphalique) tandis qu'ils vont être beaucoup plus perméables dans les reins et la rate. Cela nous emmène à définir principalement trois types de capillaires (Figure I.8) : continus, fenestrés ou discontinus.

-Le capillaire continu a un endothélium constitué de cellules endothéliales très jointives très riches en jonctions serrées. Ce type de capillaire est retrouvé dans le muscle et le cerveau.

-Le capillaire fenestré présente des cellules endothéliales moins jointives comportant des pores avec un diaphragme. Ce type de capillaires se trouve dans les glandes endocrines, les intestins et les reins. Le capillaire fenestré sans diaphragme est retrouvé exclusivement dans les reins.

-Le capillaire discontinu ou sinusoïdal est constitué d'un endothélium moins jointif avec des espaces entre les cellules endothéliales et aussi des pores qui traversent ces mêmes cellules. Ce type de capillaire est dépourvu de jonctions serrées, et est retrouvé dans le foie, la moelle osseuse ou la rate.

Dans un même tissu, les capillaires ne sont pas perméables de façon permanente. En effet, ils le deviennent dans certaines conditions comme dans le tractus digestif après un repas, dans les muscles squelettiques pendant un exercice physique ou dans tout tissu au cours de processus inflammatoires.

Etant donné l'étroitesse de la lumière des capillaires et la faible vitesse d'écoulement du sang, pour faciliter la circulation sanguine adaptée au rythme cardiaque, les réseaux vasculaires de la plupart des organes présentent des anastomoses artérioveineuses reliant directement les artérioles aux veinules. Ainsi quand les lits de capillaires ne sont pas perméables, les sphincters pré-capillaires des artérioles restent contractés et favorisent la circulation sanguine.

3d. Régulation de la fonction des capillaires

Plusieurs paramètres peuvent influencer les échanges entre les capillaires et l'espace interstitiel. Parmi eux, il y a les pressions sanguines capillaire et veineuse, la pression interstitielle, les pressions osmotiques sanguine et interstitielle. De plus des messagers primaires tels que les molécules inductrices de perméabilités ou stabilisatrices de la barrière endothéliale influencent fortement les échanges entre les capillaires et les tissus sous-jacents. L'action de certaines de ces molécules est exposée dans le chapitre II.

I.2.2.2.4. Veines et veinules

Les veines et les veinules sont les derniers vaisseaux sanguins qui ferment la boucle du système cardiovasculaire. Les veinules sont directement reliées aux capillaires ou aux artérioles et plusieurs veinules se joignent pour former une veine de taille beaucoup plus grande.

4a. Anatomie des veines

Comme les artères, les veines sont constituées de trois tuniques à savoir l'adventice, la media et l'intima. La paroi des veines est beaucoup moins épaisse que celle des artères de par leur fine couche intermédiaire (media) de muscle lisse et de fibres élastiques (voir Figure I.6). Les veines infra-cardiaques présentent des valves (ou valvules), empêchant la circulation veineuse à contre-sens et s'opposant à la force de gravité qui tend à pousser le sang vers les membres inférieurs. Les valves sont constituées d'un tissu conjonctif dense, surmonté de cellules endothéliales, correspondant à un repli de l'intima. Les veines présentent des diamètres beaucoup plus grands que les artères.

4b. Fonction des veines et veinules

Les veinules d'abord et les veines ensuite assurent le « retour veineux » du sang en provenance des artères et des capillaires vers le cœur. Leur grande taille leur permet de drainer un volume sanguin plus élevé que les artères. Cependant, la pression sanguine dans les veines les plus périphériques est dix fois plus faible que celle des capillaires et des artères. La différence de pression entre les veines et les oreillettes entraîne une faible vitesse de drainage du sang des tissus au cœur. Les veines présentent une faible résistance au flux sanguin. En plus leur diamètre s'adapte au volume de sang qui leur parvient, maintenant ainsi la pression veineuse périphérique. Environ 60% du volume de sang total est contenu dans les veines systémiques (à n'importe quel moment) alors que leur pression est très faible (moins de 10 mmHg). Cette faible pression sanguine veineuse est insuffisante à elle seule pour assurer le retour veineux, surtout depuis les zones éloignées du cœur comme les pieds. Les veines passent donc entre les muscles squelettiques qui, au cours de leur contraction, exercent une pression pour faciliter le retour veineux (Figure I.9). Cette action des muscles squelettiques sur le retour veineux est souvent décrite comme étant une fonction de pompe des muscles squelettiques.

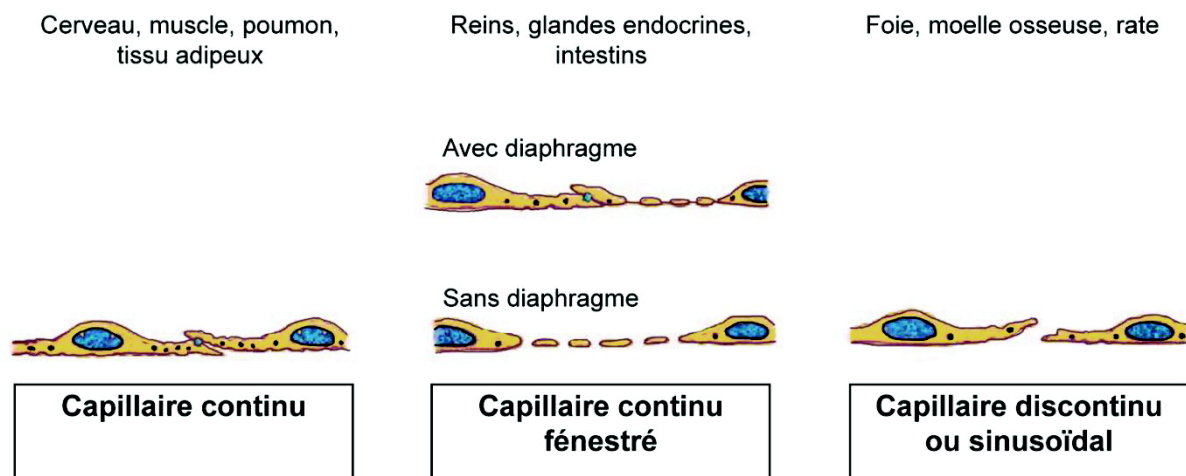


Figure I.8: Différents types de capillaires en fonction des organes. On peut constater l'endothélium continu, continu fenêtré (avec ou sans diaphragme) et l'endothélium discontinu. Le diaphragme est composé de mucoprotéine.

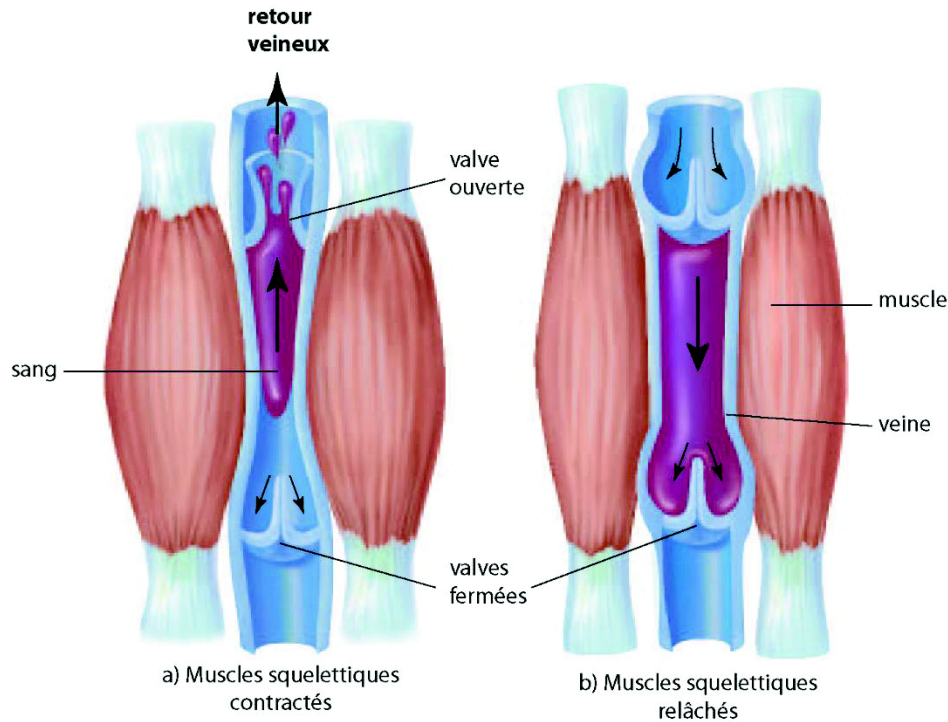


Figure I.9: Pompe musculaire et retour veineux. a) La contraction musculaire provoque une pression sur la veine entraînant l'ouverture des valves en avant et pousse le sang vers le cœur ; b) le relâchement des muscles provoque la fermeture des valves pour éviter une circulation à contre sens du sang (Modifiée de (Mader 2006))

4c. Régulation de la fonction des veines

Le retour veineux peut être influencé par plusieurs médiateurs. En effet, la noradrénaline libérée par le système nerveux sympathique induit la constriction des veines. Cela augmente la pression veineuse et le volume de sang conduit au cœur. En plus du système sympathique, le diamètre des veines est aussi régulé par les vasoconstricteurs tels que l'épinephrine. Cependant le principal facteur qui influence le retour veineux est la pression induite par la contraction des muscles squelettiques

I.3 Système vasculaire lymphatique

Le système lymphatique est constitué de vaisseaux et d'organes lymphoïdes. Dans les vaisseaux lymphatiques coule un fluide, la **lymphe**, qui a à peu près la même composition que le plasma. Il existe des organes lymphoïdes primaires comme la moelle osseuse et le thymus ainsi que des organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques ou encore la rate. Dans cette section sont décrits brièvement les vaisseaux lymphatiques et leurs fonctions. L'exemple du ganglion lymphatique est évoqué parmi les organes lymphoïdes.

I.3.1 Vaisseaux lymphatiques

Les vaisseaux lymphatiques sont très proches des vaisseaux sanguins et complètent la fonction de ces derniers en drainant les excès de fluide non récupéré par les capillaires sanguins et se trouvant dans l'espace interstitiel (Figure I.10).

I.3.1.1 Structure des vaisseaux lymphatiques

Les vaisseaux lymphatiques sont constitués d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une membrane basale qui les ancre dans les tissus. Les cellules endothéliales des capillaires lymphatiques se chevauchent et forment ainsi des jonctions plus ou moins poreuses. En effet, ces jonctions peuvent être ouvertes quand la pression est plus forte dans l'espace interstitiel que dans les capillaires, et fermées quand la pression interstitielle est faible par rapport à celle des capillaires. Plusieurs capillaires lymphatiques se joignent pour former un canal ou tronc lymphatique et plusieurs canaux lymphatiques afférents entrent dans un ganglion lymphatique. Comme les veines infra-cardiaques, les vaisseaux lymphatiques contiennent des valves permettant l'écoulement à sens unique de la lymphe.

I.3.1.2 Fonction des vaisseaux lymphatiques

Normalement plus de 80% du volume du liquide plasmatique déversé par les capillaires sanguins est réabsorbé par ces derniers et le reste est réabsorbé par les capillaires lymphatiques jusqu'aux gros vaisseaux lymphatiques pour être déverser dans les deux veines sous-clavières. Ce drainage se fait toujours dans le sens des tissus vers la veine. Le système lymphatique draine de petits volumes de liquide de façon continue à travers les jonctions intercellulaires endothéliales. Une autre fonction majeure des vaisseaux lymphatiques dans l'homéostasie est d'assurer l'absorption des nutriments du tractus digestif pour les acheminer vers le sang.

En plus de ces fonctions, les vaisseaux lymphatiques transportent aussi les cellules du système immunitaire et les corps étrangers comme les bactéries. De plus les cellules tumorales profitent souvent de ce même mécanisme de transport pour aller former une nouvelle tumeur différente de la tumeur primaire dans un autre emplacement ou organe (*processus métastatique*).

I.3.1.3 Régulation des fonctions des vaisseaux lymphatiques

Les mêmes facteurs qui influencent le retour veineux, comme le système nerveux sympathique, les hormones ou la contraction des muscles squelettiques, modulent aussi le flux lymphatique

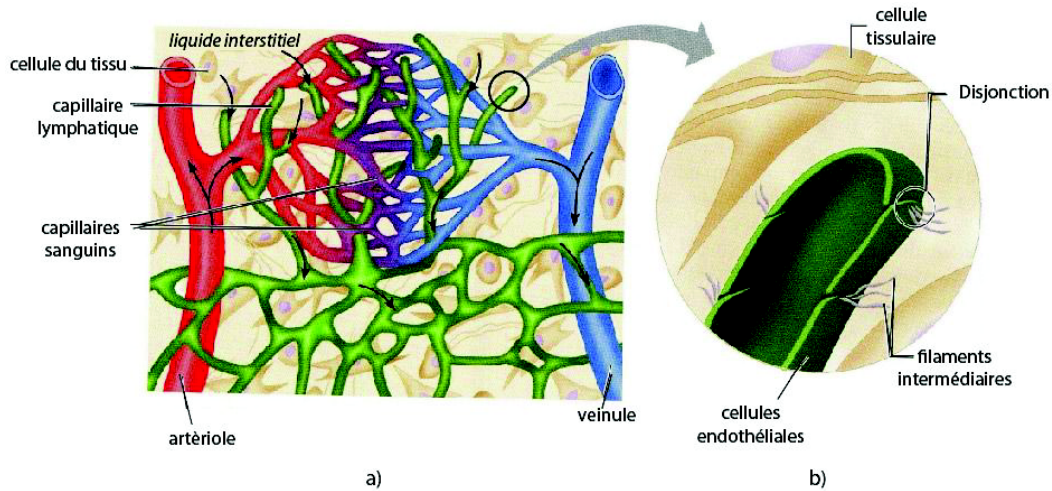


Figure I.10: Distribution et particularité structurale des capillaires lymphatiques. a) lit capillaire lymphatique par rapport aux capillaires sanguins ; b) les cellules endothéliales lymphatiques se chevauchent et forment des disjonctions (Modifiée de (Mader 2006))

I.3.2 Ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques sont des organes lymphoïdes secondaires qui sont des lieux de concentration des lymphocytes et d'activation de la réponse immunitaire adaptative.

I.3.2.1 Structure d'un ganglion lymphatique

Les ganglions lymphatiques sont des petites structures ovales auxquelles sont branchés plusieurs vaisseaux lymphatiques. Ils ont un tissu conjonctif qui forme la capsule du ganglion et qui permet de diviser l'organe en plusieurs compartiments (Figure I.11). Le ganglion contient en plus de la capsule :

Le sinus capsulaire qui permet l'arrivée des antigènes par les vaisseaux lymphatiques afférents ;

Le cortex du ganglion est le lieu de prolifération et de différenciation des lymphocytes B qui y sont regroupés en amas nommés follicules, responsables du grossissement des ganglions en cas de stimulation antigénique ;

Le paracortex abrite les lymphocytes T et les cellules dendritiques ;

Le hile est la zone par laquelle sort le vaisseau lymphatique efférent et entrent les vaisseaux sanguins

I.3.2.2 Fonction des ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques servent de filtre à la lymphe. Ils servent aussi de lieu de concentration des antigènes et des lymphocytes. Ils permettent la prolifération des lymphocytes B, les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques. Les ganglions lymphatiques sont essentiels dans la défense contre les organismes étrangers comme les bactéries et les cellules tumorales.

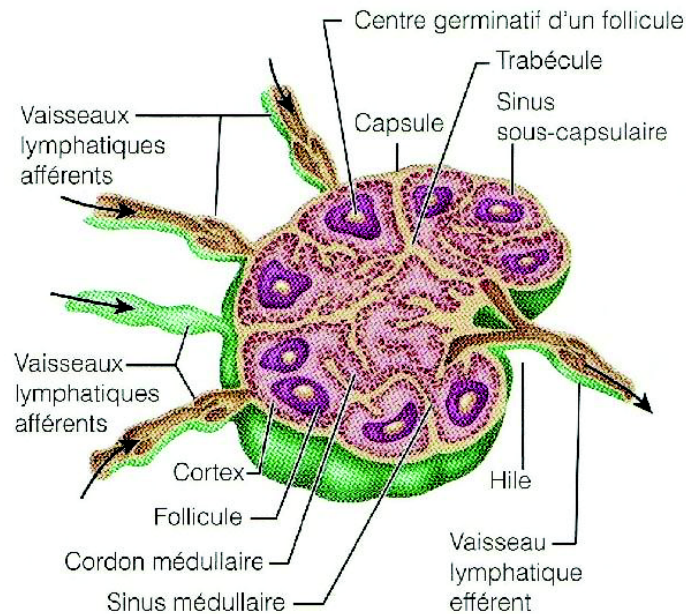


Figure I.11: Structure anatomique d'un ganglion lymphatique. Les flèches noires indiquent le sens de circulation de la lymphe (Modifiée de (Mader 2006))

I.4 Exemples de dysfonctions cardiovasculaires

La dérégulation des différentes composantes des systèmes cardiovasculaire et lymphatique peut entraîner l'apparition de maladies cardiovasculaires. Nous allons évoquer certaines de ces maladies et dysfonctionnements.

I.4.1 Hypertension

L'hypertension est définie comme une augmentation chronique de la pression artérielle systémique pour dépasser les seuils de 140/90 mmHg en pressions systolique et diastolique respectivement. En théorie, l'hypertension est le résultat soit de l'augmentation du volume de sang propulsé par le cœur soit de la résistance périphérique générée par la constriction des artérioles périphériques ou les deux. La cause de cette vasoconstriction est connue dans certains cas parmi lesquels se trouvent les maladies endommageant les reins ou diminuant sa perfusion en sang qui sont associée à l'hypertension rénale. Cette hypertension est due à la sécrétion de rénine par les reins, qui à son tour stimule la génération d'Angiotensine II, un fort vasoconstricteur. Mais la cause de l'hypertension chez 95% des personnes est inconnue et appelée hypertension essentielle. La rétention excessive de NaCl a été proposée comme étant un facteur contribuant à l'hypertension de certaines personnes génétiquement prédisposées.

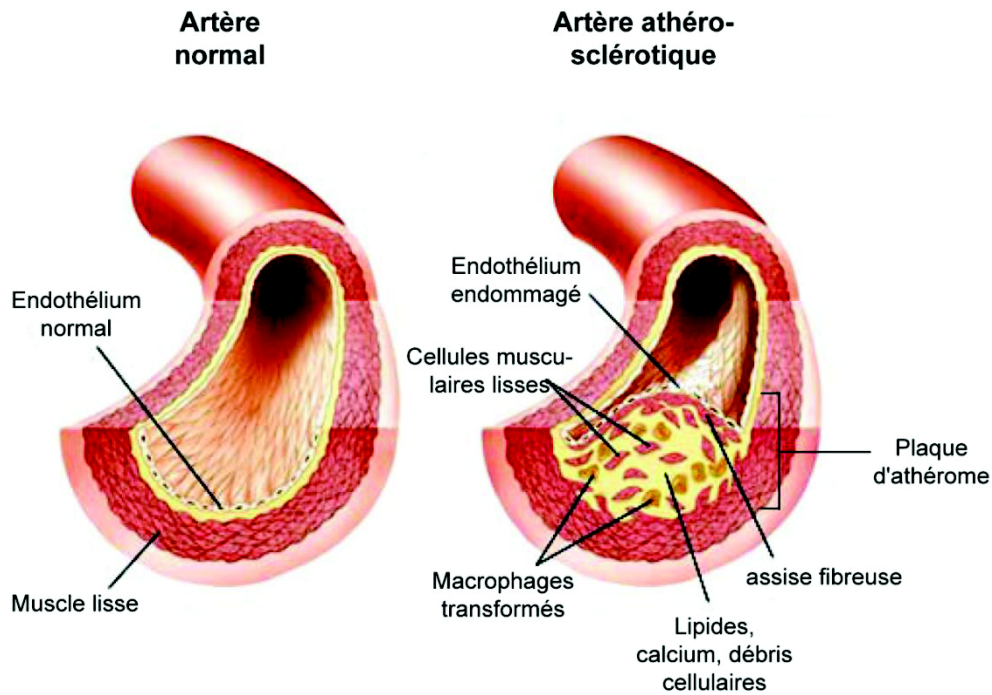


Figure I.12: Aspect morphologique d'une artère normale et d'une artère athérosclérotique
(D'après *Encyclopedia Britannica, Inc 2007*)

L'hypertension peut causer de nombreux autres problèmes cardiovasculaires dont l'hypertrophie du ventricule gauche pour s'adapter à l'augmentation de la pression artérielle périphérique. La présence d'hypertension prédispose au développement de l'athérosclérose, des attaques cardiaques, des dommages rénaux et l'accident vasculaire cérébral.

I.4.2 Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie des artères caractérisée par un épaississement d'une portion de la paroi des artères (entre la media et l'intima) à cause d'un nombre anormalement élevé de cellules musculaires lisses, de macrophages, de lymphocytes conduisant à la formation d'une plaque d'athérome, de sa richesse en cholestérol, substances adipeuses, de matrice des tissus conjonctifs et minéraux (voir Figure I.12).

L'athérosclérose peut entraîner une réduction du flux sanguin des artères coronaires à cause de l'excès de cellules musculaires lisses, de la réduction du diamètre interne des artères et une augmentation de la résistance au flux. Les cellules endothéliales dans la zone athérosclérotique sont dysfonctionnelles et libèrent majoritairement des médiateurs vasoconstricteurs (comme endothéline-1) et peu de vasodilatateurs (comme la prostacycline ou l'oxyde nitrique NO). La réduction du diamètre de l'artère se fait de façon progressive, mais parfois peut conduire à l'obstruction complète due très souvent à la thrombose coronarienne pouvant déclencher une attaque cardiaque.

L'athérosclérose est souvent initiée par l'agression de l'endothélium vasculaire et du muscle lisse sous-jacent, conduisant à une réponse inflammatoire et proliférative qui protège en première intention mais qui au bout du compte devient excessive. Cela finit par altérer le fonctionnement normal de l'artère.

I.4.3 Œdème

L'œdème est un gonflement tissulaire qui survient à la suite d'une accumulation excessive de fluide dans l'espace interstitiel. De nombreux facteurs peuvent être à la base de cette accumulation de liquide. Parmi ces facteurs il y a l'augmentation de la perméabilité vasculaire des lits de capillaires, la diminution de la réabsorption du liquide interstitiel par les capillaires et les veinules due à une diminution des protéines plasmatiques, une forte augmentation de la pression veineuse et un drainage insuffisant du fluide tissulaire restant par les vaisseaux lymphatiques. L'œdème est associé à de nombreuses pathologies inflammatoires et à certaines infections.

I.5 Conclusion

La croissance et la survie de tous les tissus de l'organisme nécessitent qu'ils soient approvisionnés en nutriments et en gaz, et débarrassés des déchets générés par le métabolisme. Le système cardiovasculaire assure l'écoulement du sang dans toutes les parties du corps afin qu'il puisse les servir en nutriments et gaz. Les différences de pressions sanguines dans les différents vaisseaux sanguins permettent une circulation sanguine continue et optimale. Le sang doit garder sa composition pendant la circulation jusqu'aux lits de capillaires où sont effectués des échanges avec les tissus. Pour ce faire, c'est l'endothélium vasculaire qui évite des fuites aux vaisseaux en servant de barrière semi-perméable et permet des échanges au niveau des capillaires. Le système lymphatique est aussi très important dans le dispositif car permet la réabsorption de l'excès de liquide interstitiel non absorbé par les capillaires et les veinules.

Les dysfonctions des systèmes cardiovasculaire et lymphatique peuvent être à l'origine du développement de l'hypertension artérielle, d'œdème, d'athérosclérose voire des infarctus du myocarde ou encore des accidents vasculaires cérébraux.

Chapitre II: Endothélium vasculaire et homéostasie des vaisseaux

Sommaire

CHAPITRE II: ENDOTHELIUM VASCULAIRE ET HOMEOSTASIE DES VAISSEAUX	34
II.1 Introduction	34
II.2 Formation de l'endothélium et développement vasculaire	35
II.2.1 Vasculogenèse	35
II.2.2 Angiogenèse	37
II.2.3 Différenciation artérioveineuse	44
II.2.4 Néovascularisation chez l'adulte	46
II.3 Endothélium et modulation de la perméabilité vasculaire	48
II.3.1 Perméabilité basale	49
II.3.2 Perméabilité induite	50
II.3.3 Agents influençant la perméabilité	51
II.4 Régulation du trafic des leucocytes par l'endothélium	56
II.4.1 Extravasation leucocytaire dans les veinules post-capillaires	57
II.4.2 Extravasation dans d'autres vaisseaux	59
II.5 Endothélium et vasomotricité	61
II.6 Conclusion	62

II.1 Introduction

L'endothélium vasculaire est la monocouche cellulaire la plus interne dans tous les vaisseaux sanguins et lymphatiques. D'origine mésodermique, l'endothélium provient de la différenciation des hemangioblastes et angioblastes en cellules endothéliales au cours du développement embryonnaire (Augustin, Kozian et al. 1994, Coultas, Chawengsaksophak et al. 2005). Les cellules endothéliales établissent des contacts entre elles pour servir de barrière plus ou moins perméable assurant ainsi l'intégrité du réseau vasculaire. Les cellules endothéliales ont une importance capitale dans la physiologie et la fonction des systèmes cardiovasculaire et lymphatique. En plus de son rôle de barrière physique à la perméabilité pour les échanges de nutriments et de fluide entre le sang et les tissus environnants, l'endothélium régule le transport des macromolécules. Il libère de nombreux agents paracrines qui peuvent agir sur les cellules musculaires lisses adjacentes, notamment des vasodilatateurs (prostacycline et NO) et des vasoconstricteurs (comme l'endoheline-1). Il joue un rôle majeur dans le remodelage vasculaire en sécrétant de facteurs paracrines et autocrines qui peuvent agir sur les autres types cellulaires des vaisseaux et sur les cellules endothéliales mêmes. De ce fait les cellules endothéliales sont à la base de l'angiogenèse qui est la formation de nouveaux vaisseaux à partir de réseaux vasculaires sanguins

existants. De plus, elles secrètent aussi des cytokines au cours de la réponse immunitaire et participent à la synthèse ou au métabolisme des hormones. Le rôle de l'endothélium vasculaire, de même que sa morphologie, diffère selon les organes et selon le type de vaisseaux le contenant. Cela conduit à la notion d'hétérogénéité de l'endothélium en fonction des organes.

Dans ce chapitre, je décris l'implication de l'endothélium dans le développement vasculaire et quelques rôles de l'endothélium chez l'adulte en fonction des types de vaisseaux ou des organes afin de cerner l'importance de la monocouche de cellules endothéliales dans l'homéostasie des vaisseaux.

II.2 Formation de l'endothélium et développement vasculaire

Le système cardiovasculaire est l'un des premiers systèmes fonctionnels à se mettre en place pendant le développement embryonnaire afin de soutenir la croissance des autres tissus, en les approvisionnant en nutriments et en oxygène entre autres. Le système vasculaire se développe à la suite de trois processus successifs : **la vasculogénèse**, la formation de novo de vaisseaux sanguins, permettant la formation des premiers plexus primaires de capillaires ; **l'angiogénèse**, qui correspond à la formation de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, conduisant à l'expansion du plexus néoformé en système vasculaire ; et la dernière étape est la **différenciation artérioveineuse** qui, sous l'influence du flux et du shear stress, permet le développement des artères, artérioles, veines et veinules. Dans toutes ces étapes l'implication de l'endothélium est primordiale pour leur bon déroulement.

II.2.1 Vasculogénèse

C'est la première étape du développement vasculaire embryonnaire qui commence après la gastrulation, de façon concomitante à la formation des somites. La vasculogénèse a été décrite en 1988 par Risau et al comme étant la formation de novo de vaisseaux sanguins à partir de cellules progénitrices endothéliales (Risau, Sariola et al. 1988). Chez la souris, certaines cellules mésodermiques du sac vitellin appelées hémangioblastes migrent, se différencient et s'associent pour former des îlots sanguins (voir Figure II.1). Les cellules périphériques des îlots, les angioblastes, se différencient pour donner des cellules endothéliales tandis que les cellules internes des îlots deviennent des précurseurs de cellules hématopoïétiques.

Les angioblastes apparaissent d'abord dans les tissus extra-embryonnaires et puis dans l'embryon, où elles adhèrent à l'endoderme. Les angioblastes donnent des cellules endothéliales qui forment les vaisseaux primitifs en forme de tube avec une membrane basale. Les vaisseaux primitifs forment des capillaires branchés en réseau appelé plexus vasculaire primaire. Ainsi la vasculogénèse permet la formation des premiers capillaires dans le mésenchyme de la tête de l'embryon. Au stade de 2 somites, les vaisseaux primaires extra et intra-embryonnaires s'anastomosent alors que l'embryon est toujours

capable de s'oxygéner par la simple diffusion de l'oxygène (Risau and Flamme 1995). Le plexus se connecte ensuite au cœur primitif avant les premiers battements. L'aorte dorsale et la veine cardinale sont formées directement par la vasculogenèse (Adams and Alitalo 2007). En plus de la formation du plexus vasculaire primaire, la vasculogenèse permet la vascularisation de plusieurs organes en développement comme le foie, la rate et les poumons (Pardanaud and Dieterlen-Lièvre 1993, Ribatti, Nico et al. 2009).

De nombreuses études ont permis de connaître les mécanismes moléculaires mis en jeu pendant la vasculogenèse embryonnaire. Il est maintenant assez clair que les médiateurs sécrétés comme les BMPs (bone morphogenetic proteins) et les Wnts (wingless integration proteins) déterminent le lignage des progéniteurs endothéliaux à partir de cellules mésodermiques (Gupta, Zhu et al. 2006, Lindsley, Gill et al. 2006). Le VEGF (vascular endothelial growth factor) ainsi que le bFGF – pour basic fibroblast growth factor – produits par l'endoderme et Shh (pour Sonic Hedgehog) produit par la notochorde sont essentiels pour la différenciation des hémangioblastes. Le VEGF agit de façon paracrine sur les hémangioblastes exprimant VEGFR-2 (VEGF récepteur 2) et permet leur prolifération et différenciation en îlots sanguins (Flamme, Breier et al. 1995). En effet, les embryons de souris déficients en VEGFR-2 meurent entre le jour E8,5 et E9,5 à cause de l'absence de développement des cellules hématopoïétiques et endothéliales démontrant l'importance capitale de ce récepteur pour le

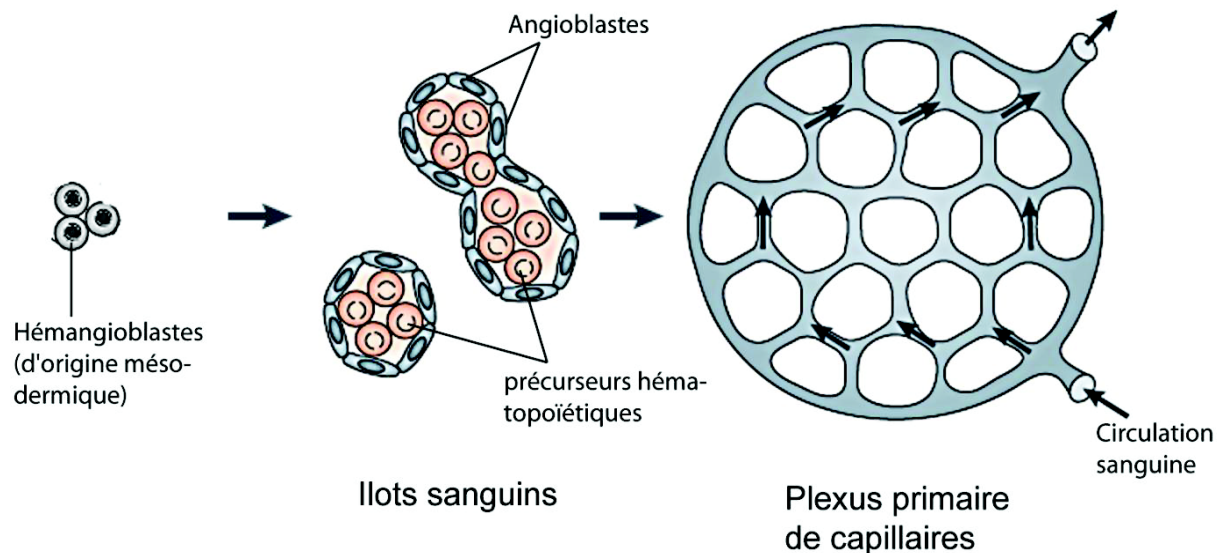


Figure II.1: Développement vasculaire par vasculogenèse (modifiée de (Adams and Alitalo 2007)). Les hémangioblastes (précurseurs des cellules endothéliales et hématopoïétiques) se différencient pour donner les îlots sanguins dont les cellules périphériques donnent les capillaires tandis que les cellules internes deviennent des cellules sanguines.

développement vasculaire (Shalaby, Rossant et al. 1995). De plus, Carmeliet et al ont montré que les embryons de souris déficients en VEGF meurent à la moitié de la gestation (E9,5) même s'ils ne présentent pas le même phénotype que chez les embryons VEGFR-2^{-/-} (Carmeliet, Ferreira et al. 1996).

La voie de signalisation du facteur Shh est aussi particulièrement importante car les embryons de caille dépourvus de Shh ou du récepteur SMO (pour *smoothed*) présentent une forte désorganisation des structures vasculaires embryonnaires (Vokes, Yatskievych et al. 2004). Dans les stades tardifs de la vasculogénèse l'expression de molécules d'adhérence intercellulaire, comme le ZO-1 (zonula occludens 1) des jonctions dites serrées, la VE-cadhérine (pour vascular endothelial cadherin) et la β -caténine des jonctions adhérentes, permettent de stabiliser les contacts intercellulaires afin d'assurer la cohésion de l'endothélium primitif (Ribatti, Nico et al. 2009).

II.2.2 Angiogenèse

L'angiogenèse permet l'extension du plexus néoformé par la vasculogénèse. Cette extension s'effectue par l'intermédiaire de deux processus moléculaires distincts et indépendants qui sont le bourgeonnement endothélial et l'intussusception vasculaire. Pour une revue plus complète voir (Adams and Alitalo 2007).

II.2.2.1 Bourgeonnement endothélial

II.2.2.1.1. *Différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement*

L'angiogenèse par bourgeonnement endothélial des capillaires se compose de plusieurs étapes aussi importantes les unes que les autres (voir Figure II.2). Sous l'action du facteur pro-angiogénique, certaines cellules subissent un changement de leur polarité baso-apicale, une diminution de la force de leurs jonctions intercellulaires, qui deviennent plus mobiles et invasives. Ces cellules endothéliales mobiles et invasives, sont appelées « tip cells » ou cellules du front de migration (Adams and Alitalo 2007). Ce sont des cellules dotées de nombreuses extensions filopodiales qui fonctionnent comme des senseurs de l'environnement et guident la croissance des vaisseaux. Elles inhibent latéralement la réponse des autres cellules de l'endothélium, au facteur angiogénique dans un premier temps, par expression de ligand DLL-4 (Delta like ligand 4) et activation de la voie Notch des cellules adjacentes. En effet si toutes les cellules endothéliales, de la région tissulaire de la stimulation angiogénique, devaient se dissocier, migrer et proliférer en même temps, cela aurait engendré une désintégration du vaisseau compromettant la perfusion de l'organe. D'où l'importance des cellules du front qui se détachent partiellement des autres et migrent pour déterminer le chemin du nouveau vaisseau en sécrétant des protéases comme les métalloprotéases pour dégrader la membrane basale. L'orientation du vaisseau est déterminée par la balance des facteurs pro- et anti-angiogéniques de la matrice extracellulaire et libérés sous l'action des protéases. Puis les cellules du front migrent et les cellules endothéliales adjacentes, appelées « stalk cells », les suivent et prolifèrent pour participer à l'accroissement du bour-

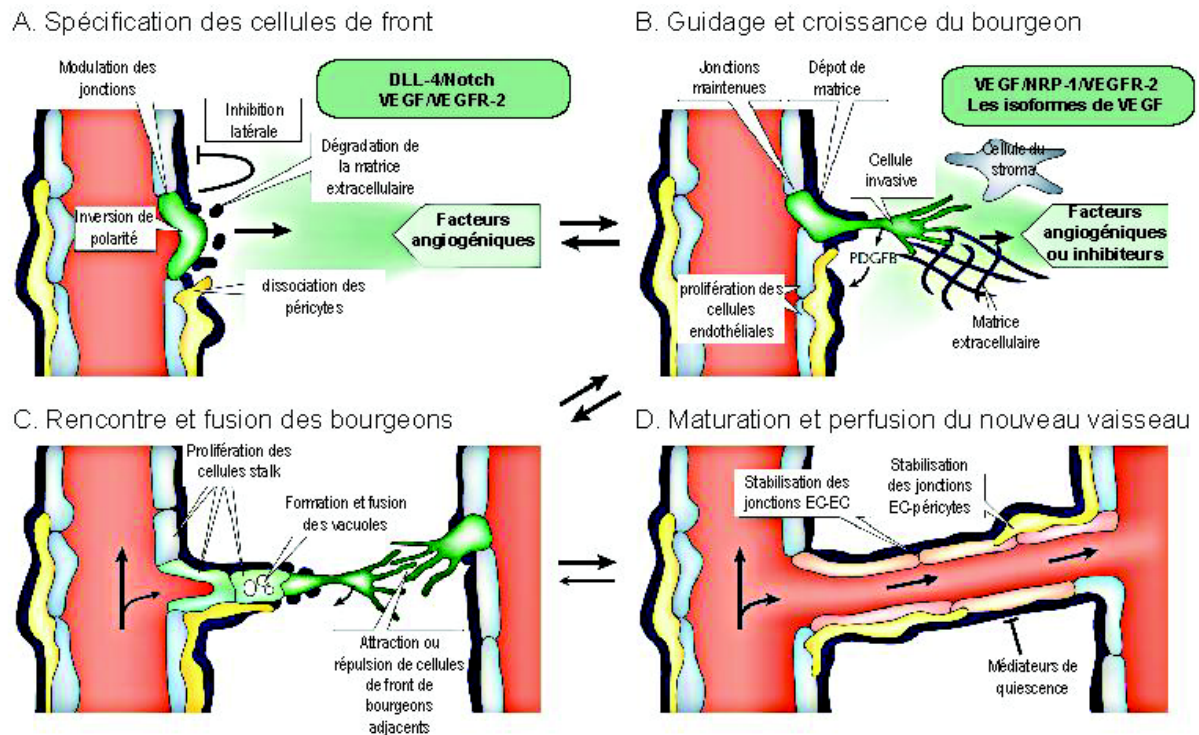


Figure II.2: Mécanisme de l'angiogenèse par bourgeonnement (modifié de (Adams and Alitalo 2007)). A. Le facteur angiogénique induit l'inversion de la polarité de la cellule du front (en vert) qui sécrète des protéases pour dégrader la membrane basale et DLL-4 pour inhiber les autres cellules endothéliales ; B. migration de la cellule du front qui devient invasive ; C. rencontre de deux bourgeons au niveau des cellules de front et formation de vacuoles qui fusionnent pour former la lumière vasculaire ; D. stabilisation du nouveau vaisseau par les jonctions endothéliales et les cellules murales pour permettre le flux sanguin

geon. Le bourgeon est ensuite relativement stabilisé par le recrutement de cellules murales (péricytes ou cellules musculaires lisses) et la forte expression de molécules de jonctions intercellulaires endothéliales. Les interactions adhésives ou répulsives des cellules du front de bourgeons adjacents régulent leur fusion pour ne faire qu'un même tube vasculaire. La lumière vasculaire se forme par la fusion des vésicules intracellulaires et intercellulaires. La circulation sanguine dans le nouveau vaisseau permet l'oxygénation du tissu, la réduction des signaux angiogéniques et induit la maturation du vaisseau.

II.2.2.1.2. Signalisation cellulaire

Plusieurs médiateurs et voies de signalisation sont impliqués dans l'angiogenèse par bourgeonnement. Ces facteurs interviennent à des moments précis afin d'assurer la formation du nouveau vaisseau pour parer au besoin d'oxygène du tissu tout en évitant d'éventuelles fuites au sein du vaisseau bourgeonnant.

2a. Guidage et prolifération induits par VEGF

2a.a. Famille du facteur VEGF

Pendant l'angiogenèse par bourgeonnement, la molécule la plus importante et qui intervient dans la plupart des étapes est le VEGF (vascular endothelial growth factor) encore appelé VPF (pour vascular permeability factor). Le VEGF est un facteur mitogène des cellules endothéliales d'une importance capitale pour le développement vasculaire (Ferrara 1999). Le VEGF est impliqué dans de nombreux processus comme l'angiogenèse, la perméabilité endothéliale, la survie des cellules endothéliales, l'inflammation ou encore la vasomotricité. La famille des VEGF est constituée à l'heure actuelle de cinq membres VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF (pour placental growth factor) qui sont tous impliqués dans la mitogenèse de cellules endothéliales vasculaires sanguines ou lymphatiques. Les facteurs VEGF-C et VEGF-D sont spécifiques du système lymphatique et régulent la prolifération des cellules endothéliales lymphatiques (Adams and Alitalo 2007). Le VEGF le plus important pour le système vasculaire sanguin est le VEGF-A plus communément appelé VEGF

2a.b. Isoformes de VEGF-A ou VEGF

Chez l'homme, il y a quatre isoformes de VEGF exprimés par épissage alternatif qui sont le VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ qui comportent respectivement 121, 165, 189 et 206 acides aminés. Le VEGF est exprimé par différents types cellulaires parmi lesquels se trouvent les cellules endothéliales, les cellules tumorales, les plaquettes sanguines et les cellules du stroma (Ferrara, Gerber et al. 2003). Le VEGF₁₆₅ est la forme prédominante exprimée par une majorité de types cellulaires, mais les ARNm des isoformes VEGF₁₂₁ et VEGF₁₈₉ sont aussi retrouvés dans les cellules exprimant le VEGF. Contrairement à ces derniers, le VEGF₂₀₆ est une forme très rare (Houck, Ferrara et al. 1991). Ces isoformes du VEGF diffèrent de par leurs capacités à se lier aux heparane sulfates de la matrice extracellulaire. Ces interactions sont dépendantes du degré de basicité des isoformes. En effet, le VEGF₁₆₅, basique, se fixe aux heparane sulfates tandis que le VEGF₁₂₁, qui est acide, ne s'y fixe pas (Houck, Leung et al. 1992). Le VEGF₁₈₉ et le VEGF₂₀₆, qui sont encore plus basiques que VEGF₁₆₅, se fixent aux heparane sulfates avec une affinité plus forte (Houck, Leung et al. 1992). Ainsi, le VEGF₁₂₁ se trouve sous forme diffusible, alors que le VEGF₁₆₅ peut être à la fois diffusible et séquestré dans la matrice extracellulaire (Houck, Leung et al. 1992). Par contre, les VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ sont exclusivement séquestrés dans la matrice (Park, Keller et al. 1993).

2a.c. Les récepteurs de VEGF et principales voies de signalisations

Dans les cellules de mammifères, la signalisation de l'effet du VEGF se fait en se liant à deux principaux récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase qui sont VEGFR-1 et VEGFR-2 (encore appelés respectivement Flt-1 pour fms-like tyrosine kinase-1 et KDR (pour kinase domain-containing receptor chez l'humain) (de Vries, Escobedo et al. 1992, Terman, Dougher-Vermazen et al. 1992). L'homologue de KDR chez la souris est Flk-1 (pour fetal liver kinase 1).

De même que les isoformes de VEGF, les VEGFRs sont aussi exprimés par différents types cellulaires. Ils ont été retrouvés dans les cellules musculaires lisses, les ostéoblastes, les myofibroblastes, les myocytes cardiaques, les neurones et divers types de cellules tumorales (Takahashi, Seko et al. 1999, Deckers, Karperien et al. 2000, Ishida, Murray et al. 2001, Carmeliet and Storkebaum 2002, Chintalgattu, Nair et al. 2003). Flt-1 et KDR, présentent 7 domaines immunoglobuline (Ig) dans leurs séquences extracellulaires, et pourtant Flt-1 présente une affinité plus forte pour le VEGF mais une activité kinase beaucoup plus faible que KDR (Terman, Dougher-Vermazen et al. 1992). Il a ainsi été proposé comme régulant l'action de VEGF car la forme soluble de Flt-1 est capable d'inhiber la mitogenèse induite par le VEGF (Kendall, Wang et al. 1996). Un troisième récepteur de la même famille a été identifié (VEGFR-3) mais qui fixe principalement VEGF-C et VEGF-D (Pajusola, Aprelikova et al. 1992) et joue un rôle dans l'endothélium lymphatique et la lymphangiogenèse.

Ces récepteurs à activité tyrosine kinase sont des protéines transmembranaires possédant une région extracellulaire impliquée dans la reconnaissance et la fixation du ligand, et une partie cytoplasmique contenant des domaines à activité tyrosine kinase, reliées entre elles par une région transmembranaire. Suite à la fixation du dimère de VEGF, deux récepteurs monomériques se dimérisent pour former un récepteur activé. En effet, les domaines kinase de chaque monomère du récepteur phosphoryle des résidus tyrosine (Y) de l'autre monomère du récepteur (auto/trans-phosphorylation), au niveau cytoplasmique, ce qui résulte en une activation du récepteur et en une cascade de transduction du signal. Le domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase est la partie où l'on retrouve le plus d'homologies entre VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Il contient une région juxta-membranaire, pouvant contenir des sites de phosphorylation sur Y, et ainsi servir de point d'ancrage à des molécules impliquées dans la signalisation. Enfin, l'extrémité C-terminale contient aussi des résidus tyrosine phosphorylables, et est impliquée également dans le recrutement de protéines de la signalisation. Pour terminer l'activité du récepteur, la cellule l'internalise par endocytose et permet sa dégradation dans un lysosome.

La localisation de VEGFR-2/KDR activé peut déterminer l'évènement moléculaire subséquent. Par exemple, l'activation de KDR associée à la VE-cadhérine des jonctions intercellulaires induit la perméabilité alors que celle de KDR associée aux intégrines induit la perméabilité et l'angiogenèse (Weis and Cheresh 2005).

La neuropiline-1 (NRP-1), un récepteur ayant la capacité de fixer les molécules de la famille des sémaphorines impliquées dans le guidage des axones, a été montrée comme pouvant fixer le VEGF₁₆₅ et servir de présentateur de VEGF à son récepteur KDR et ainsi participer à l'efficacité de la signalisation VEGF/KDR (Ferrara, Gerber et al. 2003).

L'activation de KDR peut déclencher la transduction via différentes voies de signalisation intracellulaire. Il peut ainsi provoquer:

- L'activation de Src, une tyrosine kinase, et modifications des protéines des jonctions endothéliales adhérentes et serrées, ce qui conduit à leur désorganisation voire leur rupture et

l'augmentation de la perméabilité paracellulaire (voir Figure II.5) (Esser, Lampugnani et al. 1998, Antonetti, Barber et al. 1999);

- L'activation de PLC/PKC/eNOS (*phospholipase C/protein kinase C/endothelial nitric oxide synthase*) qui permet la libération de NO par les cellules endothéliales et ainsi participe à l'augmentation de la perméabilité (voir Figure II.5) (Wu, Yuan et al. 1999);
- L'activation de MAP Kinase (*mitogen-activated protein kinase*) qui conduit à la transcription de gènes importants pour la prolifération cellulaire (Landgren, Schiller et al. 1998);
- L'activation de PI(3) Kinase (*phosphatidylinositol-3-OH kinase*) et Akt/PKB qui phosphoryle et inhibe les protéines pro-apoptotiques BAD et caspase-9 conduisant à la survie des cellules endothéliales (Gerber, McMurtry et al. 1998).

2a.d. VEGF dans le bourgeonnement angiogénique

Au cours du bourgeonnement angiogénique, l'expression de VEGFR-2 est forte dans les cellules du front et fortement amoindrie dans les autres cellules endothéliales. Cette spécificité d'expression de VEGFR-2 par les cellules du front permet de les guider dans une direction qui suit le gradient de concentration de VEGF trappé dans la matrice extracellulaire. Le VEGF₁₆₅, qui peut se lier aux heparane sulfates de la matrice, promeut l'extension des filopodes des cellules du front et ainsi les guide pendant la croissance du nouveau vaisseau (Ruhrberg, Gerhardt et al. 2002). Le VEGF₁₂₁, qui est un facteur diffusible, induit la prolifération des cellules endothéliales mais ne guide pas les cellules endothéliales du front (Ruhrberg, Gerhardt et al. 2002).

L'expression des NRP-1 et NRP-2 par les cellules du front semblent aussi avoir une importance dans la réponse différentielle des cellules endothéliales car ces récepteurs peuvent lier VEGF₁₆₅ mais pas VEGF₁₂₁ (Klagsbrun, Takashima et al. 2002, Ruhrberg, Gerhardt et al. 2002). Toutefois les défauts dans les structures vasculaires engendrés par l'abrogation du gène *Nrp-1* chez la souris sont très modérés, suggérant l'implication d'autres récepteurs de VEGF (Gerhardt, Ruhrberg et al. 2004).

2b. Spécification des cellules du front grâce à la voie Notch

Une voie très importante, autre que celle de VEGF, pour l'angiogenèse par bourgeonnement est la voie Notch activée par DLL-4 (pour Delta-like ligand 4). L'activation des récepteurs membranaires Notch et leur ligand DLL-4 est à l'origine de la spécification des cellules du front par l'inhibition des autres cellules endothéliales dans le bourgeonnement vasculaire. La réduction du niveau de DLL-4 ou l'inhibition de la signalisation des récepteurs Notch entraînent une forte augmentation du nombre de cellules de front sous l'effet de facteurs angiogéniques y compris le VEGF (Ridgway, Zhang et al. 2006, Hellström, Phng et al. 2007, Lobov, Renard et al. 2007). Dans un modèle de poisson-zèbre, il a été montré que les bourgeons restent continuellement mobiles et font beaucoup de branchements chez les embryons ayant une altération dans la voie DLL-4/Notch (Leslie, Ariza-McNaughton et al. 2007, Siekmann and Lawson 2007). Sous l'action de VEGF, les cellules du front sont les seules à exprimer

DLL-4 qui active les récepteurs Notch présents à la surface des autres cellules. Ceci a pour conséquence de supprimer l'expression de VEGFR-2 et ainsi de rendre ces cellules insensibles au VEGF (Lobov, Renard et al. 2007).

De plus le VEGF stimule par l'intermédiaire de la voie Notch, l'expression d'ephrin-B2 chez le poisson zèbre (Torres-Vázquez, Kamei et al. 2003). L'ephrin-B2 est un ligand transmembranaire dont le récepteur EphB4 a une activité tyrosine kinase. L'ephrin-B2 incrémente l'activité des récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3 dans le bourgeonnement angiogénique.

2c. Maturation et stabilisation du nouveau vaisseau

La maturation des vaisseaux en croissance consiste à recruter des cellules d'origines mésenchymateuses comme les péricytes (pour les capillaires) ou les cellules musculaires lisses (pour les gros vaisseaux tels que les veines) à la surface vasculaire. Elles sont appelées les cellules murales (Gerhardt, Golding et al. 2003). Ce processus fait intervenir plusieurs facteurs, produits par le vaisseau bourgeonnant, dont le gradient de concentrations fait migrer les cellules murales en direction du bourgeon. Le facteur principal qui permet cette migration est le PDGF-B (pour platelet-derived growth factor B), facteur de croissance sécrété par les plaquettes mais aussi par les cellules endothéliales du bourgeon en croissance. Dans la plupart des tissus, le PDGF-B sécrété par les cellules du front permet le recrutement des péricytes qui expriment leur récepteur PDGF-R β (Hoch and Soriano 2003, Tallquist, French et al. 2003). Ce recrutement est la première étape d'un processus de stabilisation du vaisseau en croissance pour garder une perfusion efficace de l'organe pendant le bourgeonnement.

Cependant, en dépit du recrutement des cellules murales à la surface endothéliale, l'établissement des jonctions intercellulaires entre cellules endothéliales et cellules murales est nécessaire de même que le renforcement des jonctions intercellulaires entre cellules endothéliales pour complètement stabiliser le nouveau vaisseau. Les interactions entre cellules endothéliales et cellules murales sont assurées par l'expression de la N-cadhérine (neuronal cadherin) par les deux types cellulaires (Paik, Skoura et al. 2004). Ainsi l'interaction homophile des molécules de N-cadhérine permet de renforcer les contacts intercellulaires établis entre cellules endothéliales et cellules murales. Le renforcement des contacts entre cellules endothéliales, est assuré par l'expression de protéines des jonctions serrées comme l'occludine et des jonctions adhérentes comme la cadhérine spécifique de l'endothélium vasculaire (VE-cadhérine) qui établissent des interactions homophiles afin d'assurer l'intégrité de l'endothélium du vaisseau néoformé (Jain 2003, Wallez and Huber 2008). Le rôle de la VE-cadhérine dans les contacts intercellulaires endothéliaux et plus spécifiquement dans l'angiogenèse sera développé plus loin dans le chapitre III.

II.2.2.2 Intussusception des vaisseaux

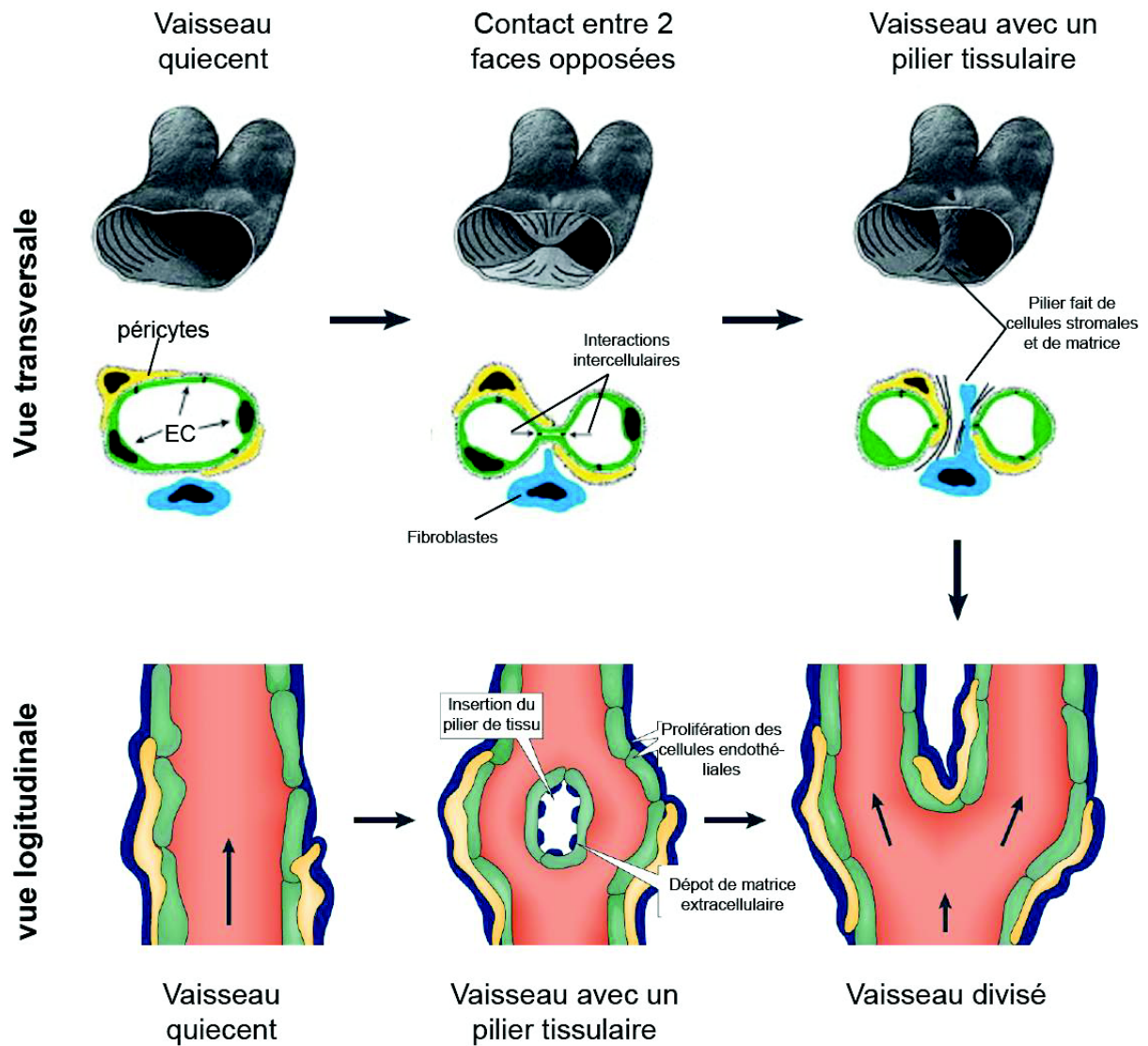


Figure II. 3: Angiogenèse par intussusception vasculaire (figure modifiée à partir de (Adams and Alitalo 2007, Ribatti and Djonov 2012))

L'intussusception est le deuxième processus angiogénique donnant naissance à des nouveaux vaisseaux à partir d'autres préexistants sans avoir recours aux processus de prolifération ou de migration des cellules endothéliales (Patan, Alvarez et al. 1992, Burri and Djonov 2002). Elle peut se résumer en 3 étapes principales qui aboutissent à la formation d'un « pilier » tissulaire à l'intérieur d'un vaisseau et le divise sur sa longueur en deux vaisseaux de plus petit diamètre (voir Figure II.3) (Ribatti and Djonov 2012).

- La première étape consiste en la création d'une zone de contact entre les cellules endothéliales de deux faces diamétralement opposées du capillaire.
- Il y a ensuite une réorganisation des jonctions intercellulaires de l'endothélium avec l'apparition d'une perforation au centre de la bicouche de cellules endothéliales. Cela entraîne la formation d'un nouveau « pilier » au centre du capillaire.

- Subséquemment, des fibres de collagène ainsi que des extensions cytoplasmiques des myofibroblastes et des péricytes envahissent le vide laissé par la perforation et participent à son élargissement pour donner naissance à deux nouvelles branches du vaisseau mère.

L'intussusception a initialement été observée dans le développement postnatal des poumons de rat. Mais depuis, elle a été démontrée dans beaucoup d'autres tissus comme le myocarde, le muscle squelettique, les reins et la rétine. L'intussusception peut avoir lieu dans les plexus de capillaires, les artérioles ainsi que dans les veines (Caduff, Fischer et al. 1986, van Groningen, Wenink et al. 1991, Zhou, Egginton et al. 1998, Djonov, Kurz et al. 2002).

Peu de choses sont connues sur le mécanisme de l'intussusception angiogénique. Néanmoins, il apparaît que le shear stress et le flux sanguin y jouent un rôle majeur (Djonov, Kurz et al. 2002). En effet, dans les conditions de forte augmentation de la pression et du flux sanguin l'apparition de piliers est observée très rapidement, en 15 à 30 minutes (Djonov, Kurz et al. 2002).

Toutefois il n'y a pas encore de preuve directe de l'implication d'une molécule spécifique dans l'intussusception. Le VEGF, le PDGF (platelet derived growth factor) et l'érythropoïétine (Epo) ont été identifiés comme ayant un rôle potentiel (Wilting, Birkenhäger et al. 1996, Hellström, Kalén et al. 1999, Crivellato, Nico et al. 2004). Un effet synergique de VEGF et de l'angiopoïétine-1 (Ang-1) a été observée dans l'intussusception (Makanya, Hlushchuk et al. 2009). Comme évoqué précédemment, le VEGF est essentiel dans la vasculogénèse ainsi que dans l'angiogénèse tandis que l'Ang-1 ne peut initier aucun de ces processus mais est nécessaire pour les étapes tardives du développement vasculaire comme la maturation et la stabilisation des vaisseaux (Ferrara, Carver-Moore et al. 1996, Suri, Jones et al. 1996).

II.2.3 Différenciation artérioveineuse

Le troisième processus impliqué dans la formation des vaisseaux est celui qui permet la différenciation des premiers plexus vasculaires en artères et veines. Ce processus, appelé différenciation artérioveineuse (Jain 2003, Torres-Vázquez, Kamei et al. 2003), se réalise grâce à l'expression de médiateurs endothéliaux montrant le caractère crucial du rôle de l'endothélium dans le développement vasculaire. Sous l'influence du flux sanguin, le shear stress subi par les cellules endothéliales semble avoir un rôle de premier plan dans la différenciation des artères.

La différenciation artérioveineuse est donc un processus très dynamique, sous le contrôle du flux sanguin et impliquant un important degré de plasticité endothéliale. Au cours des dernières années, plusieurs molécules spécifiques des cellules endothéliales artérielles ou veineuses ont été identifiées. Toutes sont également exprimées dans le système nerveux où elles contrôlent la destinée et le guidage des précurseurs neuronaux et des axones.

II.2.3.1 Notch et la différenciation des artères

Les récepteurs Notch et leurs ligands (Jagged et Delta) sont des protéines transmembranaires. La liaison du récepteur Notch avec son ligand exprimé sur la cellule voisine provoque des événements protéolytiques qui conduisent à la translocation du domaine intracellulaire de Notch vers le noyau. Ce domaine y interagit avec des facteurs de transcription et conduit à terme à l'expression d'autres facteurs de transcription nécessaires à la différenciation artérielle comme le facteur Hey. L'importance de cette voie Notch dans la différenciation des artères pendant le développement embryonnaire a été montré par invalidation génique. (Torres-Vázquez, Kamei et al. 2003).

En effet, les embryons de souris dépourvus de Notch-1 et/ou Notch-4, ou des ligands JAG-1 (Jagged-1) ou DLL-4, la preseniline qui est nécessaire au clivage de Notch ou même des membres de la famille de facteurs de transcription Hey (HEY1 et HEY2), présentent de graves défauts des vaisseaux et meurent au cours du développement embryonnaire (Nakajima, Yuasa et al. 2003, Duarte, Hirashima et al. 2004, Fischer, Schumacher et al. 2004, Krebs, Shutter et al. 2004, Limbourg, Takeshita et al. 2005).

II.2.3.2 Ephrin-B2 et EphB4

Le ligand ephrin-B2 et son récepteur EphB4 sont des protéines transmembranaires exprimées respectivement dans les artères et les veines. Le récepteur EphB4 est un récepteur à activité tyrosine kinase dont la signalisation intracellulaire implique des protéines de type Rho GTPases et Ras-GAP impliquées dans l'organisation du cytosquelette. La région intracellulaire du récepteur EphB4 comporte une tyrosine qui peut être phosphorylée et intervenir dans la signalisation intracellulaire. Wang et al. ont montré l'importance du couple ephrin-B2/EphB4 dans l'ontogénèse des artères et des veines (Wang, Chen et al. 1998). L'inactivation d'ephrin-B2 provoque une absence du remodelage des veines et des artères dans trois régions, le sac vitellin, la tête et le cœur, dès le 9^e jour de vie embryonnaire. Le ligand ephrin-B2, exprimé dans les artères et son récepteur EphB4, situé au niveau des veines, interagirait de façon réciproque dans les cellules endothéliales permettrait la différenciation des artères et des veines (Wang, Chen et al. 1998).

Les mécanismes moléculaires qui mènent à l'expression d'ephrin-B2 et de son récepteur EphB4 semblent être sous le contrôle de VEGF. En effet l'exposition des cellules endothéliales au VEGF induit une augmentation de l'expression d'ephrin-B2 par l'intermédiaire de la voie Notch. L'expression de VEGF par les nerfs périphériques contrôle la différenciation artérielle chez la souris (Mukouyama, Gerber et al. 2005). De façon similaire, l'expression d'ephrin-B2 est régulée par le VEGF chez le poisson zèbre (Torres-Vázquez, Kamei et al. 2003).

II.2.3.3 Neuropiline (NRP) :

La neuropiline-1 (NRP-1) est une protéine à un domaine transmembranaire présente chez les vertébrés. Il existe une protéine analogue à NRP-1, nommée neuropiline-2 (NRP-2), qui partage 44% d'homologie de séquence au niveau protéique. En 1997, deux études ont montré que NRP-1 était le ré-

cepteur spécifique de la protéine Sémaphorine 3A, un facteur chimiorépulsif impliqué dans le guidage axonal pendant le développement du système nerveux. Un an plus tard, une étude a montré que NRP-1 était exprimée sur les cellules endothéliales et les cellules tumorales et jouait le rôle de récepteur spécifique du VEGF₁₆₅ (Ferrara, Gerber et al. 2003). Le patron d'expression des neuropilines n'est pas le même dans les artères et les veines. La NRP-1 est retrouvée dans les artères alors que la NRP-2 est plutôt exprimée dans les veines, et le système lymphatiques (Stalmans, Ng et al. 2002, Gu, Rodriguez et al. 2003). La fixation des isoformes de VEGF par les NRP entraîne l'activation de différentes voies de signalisation et des réponses distinctes selon qu'il s'agisse d'une artère ou d'une veine (Ferrara, Gerber et al. 2003, Eichmann, Makinen et al. 2005).

II.2.4 Néovascularisation chez l'adulte

Chez l'adulte, les vaisseaux sanguins sont relativement quiescents comportant des cellules endothéliales très peu prolifératives avec une demi-vie de plus de 6 mois *in vivo* (Mehta and Malik 2006). Bien que quiescentes, les cellules endothéliales peuvent cependant, former de nouveaux vaisseaux par angiogenèse. La néovascularisation est restreinte à certains événements tels que le cycle menstruel, la grossesse et de nombreuses situations pathologiques comme la cicatrisation, l'inflammation, les maladies angiogéniques et l'invasion tumorale.

II.2.4.1 Angiogenèse physiologique chez l'adulte

II.2.4.1.1. *Le cycle menstruel*

L'angiogenèse survient à certaines périodes du cycle menstruel en particulier au début de la phase folliculaire lors de la régénération de l'endomètre. Comme le reste de la croissance endométriale, elle est sous la dépendance de l'œstradiol. VEGF est présent tout au long du cycle menstruel mais est particulièrement abondant en phase folliculaire et en période péri implantatoire. Il est exprimé dans les cellules glandulaires et stromales (Ferrara, Chen et al. 1998). En effet le gène du VEGF contient un élément de réponse aux œstrogènes (Chakraborty, Das et al. 1995, Hyder, Nawaz et al. 2000) alors que le rôle de la progestérone, bien qu'en concentration élevée, n'est pas démontré comme régulant l'expression de VEGF et ses récepteurs.

Chez la souris le cycle ovarien dure 4 à 5 jours et comportent 4 phases : le proœstrus, l'œstrus, le metœstrus et le dioœstrus, au cours desquelles œstrogène et progestérone varient avec un taux culminant entre proœstrus et œstrus (Staley and Scharfman 2005). Les taux de VEGF peuvent en conséquence être modulés au cours du cycle.

II.2.4.1.2. *Angiogenèse placentaire*

VEGFR-2 (Flk-1/KDR) joue un rôle clefs dans les conditions physiologiques et pathologiques de la placentation. Il est exprimé dans les villosités trophoblastiques et les macrophages du stroma et peut être détecté dans le sang maternel à la 6e semaine de gestation pour diminuer à la fin du 2e trimestre.

Dès le 3^e trimestre, il se produit une diminution de la sécrétion de VEGF et, parallèlement, une augmentation de la production de PlGF dans le trophoblaste villositaire et extravillous (Khaliq et al., 1996; Crescimanno et al., 2000).

II.2.4.2 Angiogenèse pathologique

L'angiogenèse est aussi associée à de nombreuses situations pathologiques comme la cicatrisation, l'inflammation, les maladies angiogéniques et l'invasion tumorale.

II.2.4.2.1. *La cicatrisation*

Ce phénomène de réparation tissulaire met en jeu de nombreux processus cellulaires et moléculaires qui sont habituellement décrits en trois phases se chevauchant partiellement : phase vasculaire ou inflammatoire, phase proliférative et enfin phase de maturation. Au cours de l'étape inflammatoire, la mise à nu du sous-endothélium vasculaire provoque l'adhésion et l'activation des plaquettes qui libèrent du VEGF mais aussi le PDGF (platelet-derived growth factor), le bFGF (basic fibroblast growth factor) et le TGF (transforming growth factor) α et β . La première étape de la cicatrisation est la formation du bourgeon charnu qui est un tissu transitoire se mettant en place après l'élimination de tissus nécrotiques et dont le but est le comblement d'une perte de substance tissulaire par un tissu fibreux. Celui-ci est composé de fibroblastes qui sécrètent les composants de la matrice extracellulaire; de myofibroblastes aux propriétés contractiles; et de vaisseaux capillaires néoformés à partir de bourgeons endothéliaux issus des anses capillaires du tissu non lésé situé en bordure du granulome inflammatoire. Ces bourgeons endothéliaux colonisent le granulome inflammatoire et se creusent pour donner des tubes capillaires qui vont former un réseau vasculaire qui s'organisera progressivement avec le temps.

II.2.4.2.2. *L'inflammation :*

Le processus inflammatoire est l'ensemble des phénomènes réactionnels déclenchés, dans un organisme vivant, par l'agression d'un agent pathogène. La réponse inflammatoire est à l'origine de la sécrétion de médiateurs, qui peuvent être pro ou anti-inflammatoires (chimiokines, cytokines) par les différentes cellules participant à la réponse inflammatoire (cellules épithéliales, cellules polynucléées, cellules mononucléées, cellules endothéliales). Ces médiateurs vont induire chimiotactisme, et prolifération, et différenciation des cellules inflammatoires. Rencontrée dans la polyarthrite rhumatoïde, l'inflammation des articulations donne lieu à une angiogenèse active (voir chapitre IV pour la description de la polyarthrite rhumatoïde)

II.2.4.2.3. *Angiogenèse tumorale :*

Le père fondateur des travaux portant sur l'angiogenèse tumorale, Judah Folkman, a ouvert une nouvelle voie en cancérologie avec de nouveaux traitements : thérapie anti-angiogénique. Ses travaux ini-

tiaux l'ont conduit à émettre l'hypothèse qu'une tumeur a besoin de nutriments et d'oxygène véhiculés par les vaisseaux sanguins pour croître. Il a proposé donc que la croissance tumorale et le développement des métastases étaient dépendants de l'angiogénèse. Il a postulé également que la néoangiogénèse tumorale reposait sur un « switch angiogénique », événement majeur dans le développement d'une tumeur puisqu'il traduit à la fois la progression d'une tumeur dormante vers un cancer invasif et le changement phénotypique des vaisseaux (Tapper, Langer et al. 1979).

Depuis, il est connu que les acteurs moléculaires qui sont impliqués dans le processus tumoral sont ceux impliqués dans le processus physiologique et que ces facteurs sont sécrétés par les cellules tumorales (Folkman 1995).

Ces molécules induisent la formation de nouveaux vaisseaux par le recrutement de cellules endothéliales proches du site tumoral. Il a également été démontré l'existence de progéniteurs endothéliaux circulants, dans le sang périphérique, pouvant participer à l'angiogénèse tumorale sous l'action de facteurs angiogéniques.

Ainsi, au sein de cet environnement pro-angiogénique créé par les cellules tumorales, les cellules endothéliales sont perpétuellement stimulées et les néovaisseaux profondément anormaux : en terme de phénotype et de marqueurs, et d'hémodynamique. Ils sont le siège d'un remodelage important. Ils sont certes augmentés en nombre, la densité capillaire est effectivement accrue mais ils sont surtout qualitativement différents de vaisseaux normaux. Ces vaisseaux sont en effet tortueux, hémorragiques et de forme irrégulière avec un recouvrement péricytaire quasiment inexistant les rendant très instables.

II.3 Endothélium et modulation de la perméabilité vasculaire

La perméabilité vasculaire peut être définie comme étant le mouvement de fluide et de molécules à travers les vaisseaux entre le sang et l'espace interstitiel des tissus. Elle nécessite une modification de la fonction de barrière de l'endothélium permettant un passage paracellulaire ou transcellulaire du fluide (pour une revue plus complète voir (Aird 2007)). La voie paracellulaire nécessite l'ouverture des contacts intercellulaires tandis que la voie transcellulaire se fait à travers les cellules endothéliales grâce aux cavéoles et les organites vésiculo-vacuolaires (VVOs). L'importance des cavéoles dans le transport transcellulaire de l'albumine a été confirmé *in vivo* avec des souris caveolin-1^{-/-} (Schubert, Frank et al. 2001). On peut distinguer deux types de perméabilité : la perméabilité basale et la perméabilité induite (Figure II.4).

II.3.1 Perméabilité basale

La microcirculation est la partie du système circulatoire concernée par les échanges gazeux et liquidiens extracellulaires. La perméabilité basale permet un flux continu de fluide et de molécules de petites tailles (moins de 6 nm de diamètre) entre les vaisseaux et les tissus environnants. En effet, la vaste majorité des solutés, de gaz et d'ions sont plus concentrés dans le plasma que dans les tissus, et le mode de transport de ces substances se fait essentiellement par diffusion passive (Pappenheimer, Renkin et al. 1951).

Indépendamment de la diffusion passive, il existe deux formes de perméabilité endothéliale : la voie transcellulaire se faisant à travers les cellules endothéliales grâce aux cavéoles et les organites vésiculo-vacuolaires (VVOs) et la voie paracellulaire qui est liée à la constitution et au fonctionnement des jonctions entre les cellules endothéliales.

- La voie transcellulaire: Cette voie concerne les molécules d'une taille supérieure à 3 nm comme l'albumine. La voie transcellulaire permet également le passage de cellules à travers l'endothélium et peut, dans ce cas, nécessiter la formation d'un canal transendothélial, ou organites vésiculo-vacuolaires (VVO) ou encore un mécanisme utilisant un récepteur (Mehta and Malik 2006).
- La voie paracellulaire: La voie paracellulaire, permettant le passage de molécules de taille inférieure à 3 nm de requérir, en cas de réaction inflammatoire, l'ouverture et la fermeture régulées et coordonnées des jonctions intercellulaires. Cette régulation est primordiale pour maintenir l'intégrité de l'endothélium et éviter, prévenir l'exposition possible de la matrice sous-endothéliale.

La perméabilité varie cependant suivant les organes. Ces différences sont en partie liées à des différences de structure des endothéliums selon lesquels se distinguent trois catégories : capillaires continus, fenêtrés et sinusoïdaux, mais aussi à des différences de structure des cellules endothéliales qui bien qu'ayant la même origine embryonnaire (hémangioblastes), présentent des différences selon les organes et les lits vasculaires. On parle d'hétérogénéité phénotypique de l'endothélium (Mehta and Malik 2006). Cette hétérogénéité est due à des différences dans les caractéristiques des jonctions intercellulaires endothéliales, la présence ou l'absence de pores dans les cellules endothéliales et/ou l'activité de la machinerie de transcytose. Ainsi, pour les jonctions serrées, leur nombre et leur complexité sont inversement proportionnels au niveau de perméabilité basale. A titre d'exemples les artères et la barrière hématoencéphalique qui sont très riches en jonctions serrées présentent une très faible perméabilité de base. De même, les souris déficientes en Claudin-5, une protéine majeure des jonctions serrées, présentent des zones de perméabilité dans le cerveau correspondant à une altération de la barrière hématoencéphalique (Nitta, Hata et al. 2003). Concernant les jonctions adhérentes, leur importance dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium a été montrée chez des souris auxquelles un anticorps anti-VE-cadhérine (*voir le chapitre III pour une description plus détaillée de la VE-*

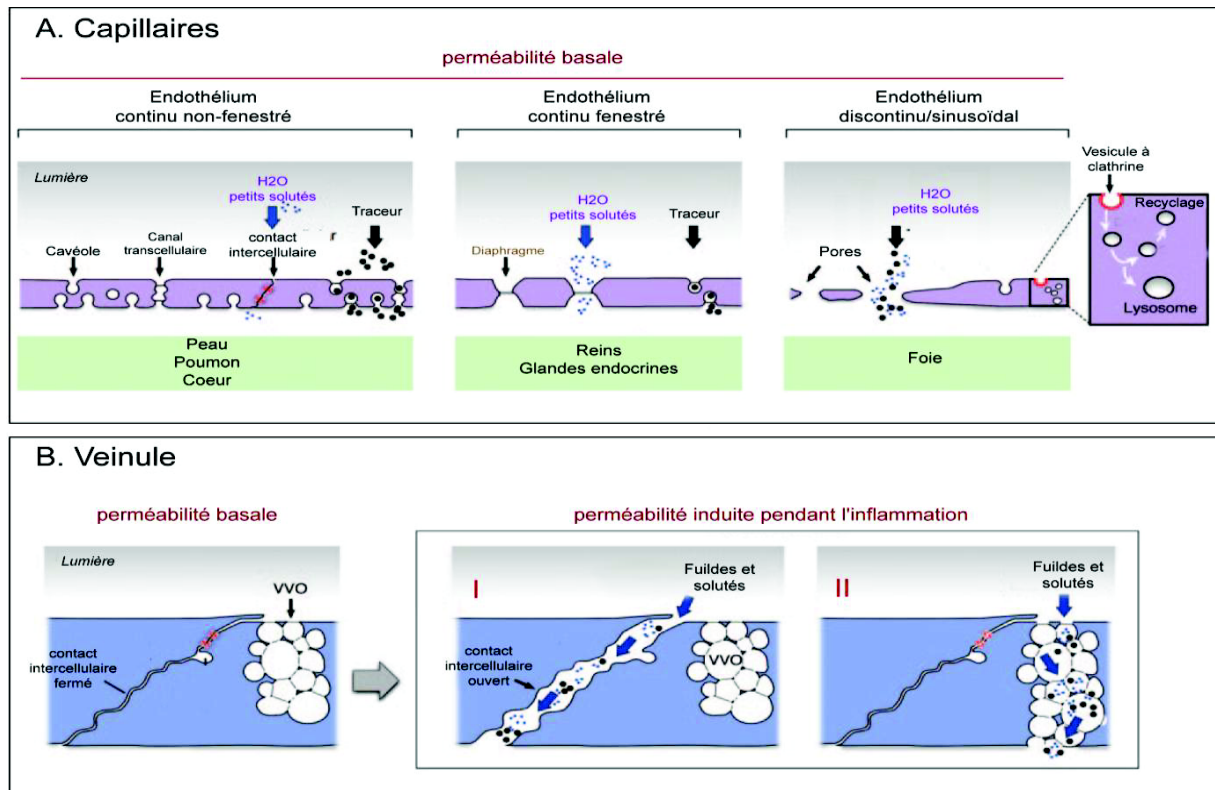


Figure II. 4: Perméabilité vasculaire basale et induite. D'après (Aird 2007). A. les mécanismes de la perméabilité basale en fonction des types d'endothélium de capillaires et des organes-; B. les mécanismes de la perméabilité basale et induite dans les veinules ; les petites molécules et les fluides passent à travers les jonctions endothéliales et les vésicules des capillaires tandis que les grosses molécules passent par les vésicules des veinules. Les facteurs inducteurs de perméabilité induisent le passage de solutés par la voie paracellulaire (I) et/ou transcellulaire (II) dans l'endothélium des veinules post-capillaires.

cadherine) avait été administré par voie systémique. En effet, les souris ont présenté des oedèmes pulmonaires et des atteintes cardiaques suggérant une fragilisation des endothéliums respectifs (Corada, Mariotti et al. 1999).

II.3.2 Perméabilité induite

Dans de nombreux cas physiologiques ou pathologiques, souvent liés aux processus inflammatoires aigus ou chroniques, l'intégrité de l'endothélium est perturbée et l'endothélium devient alors perméable. Cette perméabilité induite a lieu préférentiellement dans l'endothélium des veinules post-capillaires. Le mécanisme d'action des agonistes induisant la perméabilité est très controversé. Celui admis de façon la plus large est la rétraction des cellules endothéliales pour former des lacunes intercellulaires (Majno and Palade 1961, Majno, Palade et al. 1961, McDonald, Thurston et al. 1999), sous l'action de l'histamine, la sérotonine, la bradykinine ou le VEGF. Un autre mécanisme propose

l'implication des VVOs dans la voie transendothéliale permettant le passage induit de macromolécules à travers l'endothélium (Feng, Nagy et al. 1997, Feng, Nagy et al. 2002).

La prédilection des veinules post-capillaires comme site d'augmentation de la perméabilité peut s'expliquer par la relative abondance de VVOs dans ces veinules, la pauvreté en jonctions serrées et l'expression préférentielle des récepteurs à l'histamine, à la sérotonine ou à la bradykinine. Il est moins clairement démontré que toutes les veinules post-capillaires du corps humain présentent les mêmes capacités. D'autres types de vaisseaux comme les grosses veines, les artérioles et les capillaires peuvent aussi voir leur endothélium altéré dans des conditions d'inflammation sévère. Par exemple, chez des souris préalablement injectées avec de l'isothiocyanate de fluoresceine greffé à du dextran, le TNF α (Tumeur Necrosis Factor alpha) induit une accumulation de la molécule fluorescente dans la paroi de la veine cave. L'analyse en microscopie électronique de la veine a montré la présence de lacunes intercellulaires endothéliales, après action du TNF α (Eriksson, Karlof et al. 2005). Dans un modèle de rétinopathie diabétique chez le rat, c'est d'abord dans les artérioles et les veinules que la perméabilité paracellulaire augmenterait, et pour finir par les capillaires (Barber and Antonetti 2003). Le VEGF peut également induire la formation de lacunes intercellulaires et de pores transendothéliaux, dans les capillaires et les veines post-capillaires (Roberts and Palade 1995).

II.3.3 Agents influençant la perméabilité

De nombreux médiateurs, sécrétés dans les conditions homéostatiques, inflammatoires ou d'angiogenèse, ont des effets inducteurs de perméabilité ou stabilisateurs du rôle de barrière de l'endothélium. Nous allons voir dans cette section l'action de certains de ces médiateurs sur l'endothélium vasculaire et les voies de signalisation impliquée.

II.3.3.1 Inducteurs de perméabilité

Certains agents moléculaires sont capables d'induire également une perméabilité réversible de l'endothélium qui n'affecte pas la viabilité des cellules endothéliales ni les réponses fonctionnelles. Ainsi, le VEGF augmente expérimentalement la perméabilité paracellulaire mais aussi transcellulaire par régulation du nombre de fenestrations, en augmentant des médiateurs intracellulaires tels que le calcium ainsi qu'une molécule vasoactive, le NO. Il en est de même pour la thrombine, bradykinine, l'histamine, VEGF, mais aussi le TNF α , la sphingosine 1-phosphate. La plupart de ces agonistes agissent via leur récepteur membranaire par différentes voies de signalisation intracellulaire à induire la formation de lacunes au niveau des contacts intercellulaires endothéliales ou à induire la transcytose.

II.3.3.1.1. *Thrombine*

La thrombine, une sérine-protéase qui catalyse la transformation de fibrinogène en fibrine pendant la coagulation et active également les plaquettes par les récepteurs PAR-1/-4 (protease-activated receptor

1 ou 4). Son effet inducteur de la perméabilité endothéliale *in vivo* comme *in vitro* a été largement documenté. La perméabilité vasculaire induite par la thrombine passe par une déstabilisation des jonctions intercellulaires (voie paracellulaire).

La principale voie de signalisation de la thrombine est celle qui passe par l'activation de son récepteur PAR-1 (protease-activated receptor-1) qu'elle clive dans sa partie extracellulaire (Gerszten, Chen et al. 1994) dont les fragments clivés servent de ligand à un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G hétérotrimériques (G_q , $G_{12/13}$ et $G_{i/o}$)

La voie des protéines G hétérotrimériques semble servir comme un « interrupteur » dans l'induction de la perméabilité sous l'action de la thrombine. La contribution spécifique de chaque protéine G dans la régulation de la perméabilité vasculaire induite par la thrombine reste inconnue. L'activation de ces protéines G par PAR-1 conduit principalement à la libération du calcium du réticulum endoplasmique, la déstabilisation de la contraction acto-myosine et l'inhibition de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Holinstat, Mehta et al. 2003) (Manolopoulos, Fenton et al. 1997) (Mehta and Malik 2006). Tous ces événements contribuent à la déstabilisation des jonctions endothéliales.

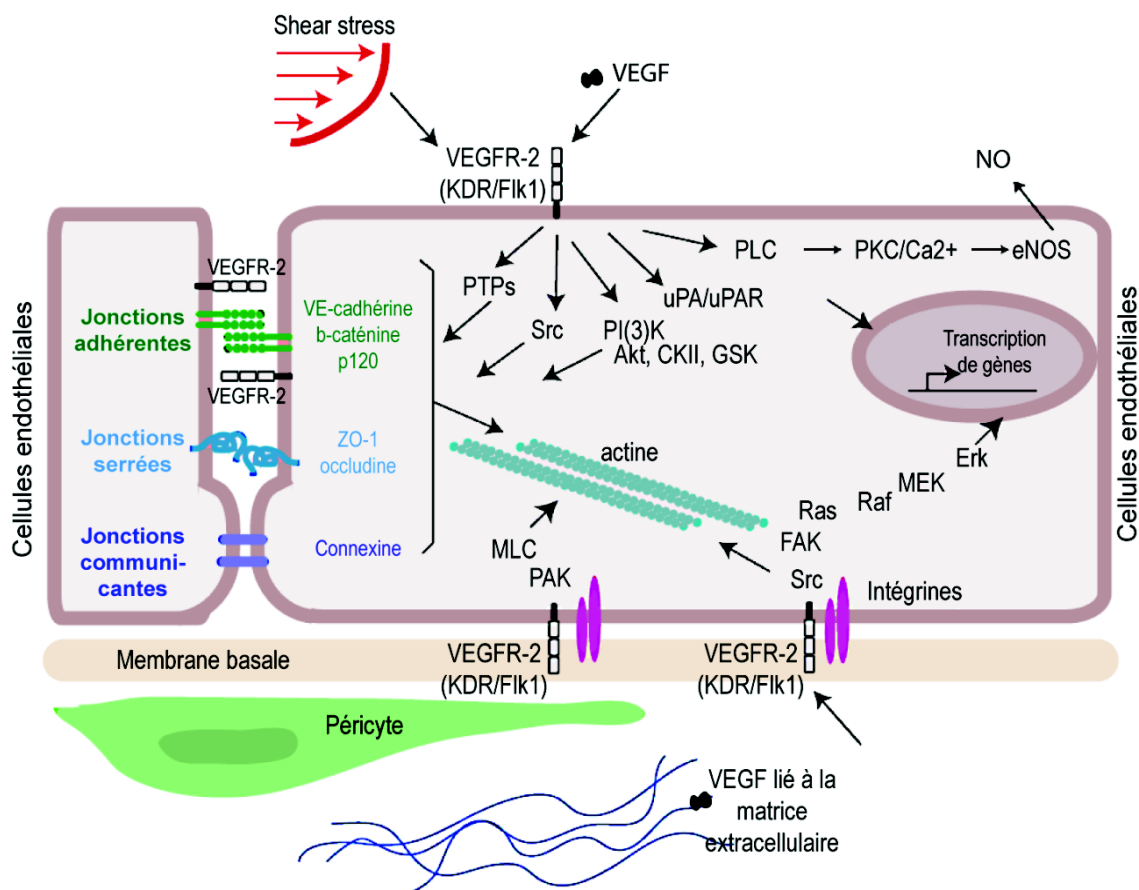


Figure II. 5: Voie de signalisation menant à la perméabilité vasculaire induite par VEGF, (modifiée d'après (Weis and Cheresh 2005))

D'autres PARs ont été identifiés dans les cellules endothéliales parmi lesquels PAR-3 et PAR-4 peuvent être activés par la thrombine mais leur implication dans la perméabilité induite par la thrombine reste à établir (Kataoka, Hamilton et al. 2003).

L'effet direct de la thrombine sur les jonctions intercellulaires notamment par clivage de la VE-cadhérine a aussi été rapporté comme participant à l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le médiateur (Schulz, Pruessmeyer et al. 2008).

II.3.3.1.2. *VEGF/VPF*

Le VEGF a été initialement découvert pour son effet inducteur de la perméabilité endothéliale, d'où son nom initial VPF (pour vascular permeability factor) (Senger, Galli et al. 1983, Senger, Perruzzi et al. 1986). Dvorak a proposé que la perméabilité des microvaisseaux induit par le VEGF serait une étape cruciale pour l'angiogénèse tumorale (Dvorak 1986). Mais plus d'une dizaine d'années plus tard, Eliceiri et al ont rapporté que la perméabilité vasculaire induite par le VEGF n'est pas nécessaire pour l'angiogénèse (Eliceiri, Paul et al. 1999). Néanmoins le VEGF d'origine tumorale induit une perméabilité vasculaire intratumorale responsable de la forte pression interstitielle observée dans certaines tumeurs solides.

Les cellules endothéliales soumises à l'action du VEGF laissent passer les fluides et les protéines par plusieurs mécanismes (voir Figure II.4). Roberts et Palade ont découvert que le VEGF induit la formation de pores à travers le cytoplasme des cellules endothéliales conduisant à extravasation de petits solutés (Roberts and Palade 1995). Le VEGF induit aussi la formation de cavéoles et de VVOs provoquant le passage de petites protéines à travers l'endothélium (Esser, Wolburg et al. 1998). Ces mécanismes doivent être les voies majeures d'extravasation des petites particules induites par le VEGF mais le passage des protéines de grandes tailles dans les mêmes conditions se fait à travers les contacts intercellulaires. Il a été rapporté par Hobbs et al que la taille des pores formées sous l'action de VEGF se trouve entre 0,2 et 1,2 μm de diamètre dans les vaisseaux d'un modèle de tumeur sous-cutanée (Hobbs, Monsky et al. 1998). De plus, le VEGF induit des lacunes intercellulaires de nombre et de taille qui dépendent de la dose de stimulation indiquant qu'on pourrait utiliser le VEGF pour manipuler la barrière endothéliale et améliorer le traitement des tumeurs (Monsky, Fukumura et al. 1999). Les mécanismes moléculaires qui emmènent à la perméabilité vasculaire induite par le VEGF sont divers (voir la Figure II.5). Cependant la phosphorylation ou le clivage des protéines de jonctions intercellulaires induites par le VEGF semblent avoir une importance capitale dans cette augmentation de la perméabilité vasculaire. Cet aspect de la molécule sera plus extensivement discuté plus loin.

II.3.3.1.3. *TNF α*

Le TNF α (tumor necrosis factor alpha) est une des cytokines proinflammatoires les plus importantes dans l'inflammation et les maladies inflammatoires. Il est produit principalement par les macrophages

mais peut l'être par différents types cellulaires dont les cellules lymphoïdes, les fibroblastes, les cellules nerveuses, les cellules endothéliales et les mastocytes (voir (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003)). Il se trouve sous deux formes : la forme membranaire (mTNF) sous forme trimérique et la forme soluble (sTNF) générée grâce au clivage de la partie extracellulaire de mTNF par TACE (TNF α -converting enzyme) à la surface des cellules. Le TNF α peut induire de nombreuses voies de signalisation en fonction du contexte et du type cellulaire cible. Ainsi il module la défense immunitaire, l'apoptose, la survie, l'angiogénèse ou encore la perméabilité vasculaire (Wang and Lin 2008).

3a. Principales voies de signalisation du TNF α

Les principales voies de signalisation du TNF α ont été largement décrites (pour une revue plus complète voir (Aggarwal 2003)). Le TNF α a deux récepteurs qui sont le TNFR-1 et TNFR-2 – pour TNF récepteur 1 et 2 respectivement – qui sont différents par leurs poids moléculaires (55 kDa pour TNFR-1 et 75 kDa pour TNFR-2) et leurs activités. Le TNFR-1 a une expression ubiquitaire alors que le TNFR-2 ne se trouve que sur les cellules immunitaires. De ce fait, c'est TNFR-1 qui permet la transduction de la majorité des effets du TNF α dans l'organisme. Le TNFR-1 contient quatre domaines : un domaine Death (DD pour death domain), un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine dit intercellulaire. Le TNFR-2 ne possède pas de domaine Death mais peut quand même induire la mort cellulaire par l'intermédiaire de TNFR-1.

Après fixation du TNF α trimérique, TNFR-1 forme des homo-trimères afin de recruter la protéine cytoplasmique TRADD (TNFR-associated death domain) et s'y associer par leurs domaines DD. La protéine TRADD sert de plateforme pour le recrutement d'autres protéines adaptatrices afin de poursuivre une ou plusieurs voies de signalisations. Ce sont ces protéines adaptatrices qui déterminent la voie de signalisation à suivre et par la même l'évènement cellulaire subséquent. Les voies majeures activées sont :

La voie NF κ B : L'association des protéines adaptatrices RIP (receptor interacting protein) et TRAF2 – pour TNFR-associated factor 2 – conduit à l'activation de I κ B kinase (IKK) par la MAP/Erk kinase kinase 3 (MEKK3) permettant la phosphorylation de I κ B – l'inhibiteur de NF κ B – par la IKK (Yang, Lin et al. 2001). Cette phosphorylation entraîne la dégradation d'I κ B par le protéasome et aboutit à la translocation de NF κ B dans le noyau pour la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation.

La voie MAP kinase : Le TNF α peut induire l'activation de Erk, JNK et p38 (extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase et la MAP kinase p38) pour différents évènements cellulaires (Devin, Lin et al. 2003). Le TNF α induit principalement la kinase JNK par l'intermédiaire de TRAF2 et de RIP, puis la cascade de phosphorylation des MAP3k/MAP2K/MAPK. Les kinases Erk et p38 sont activées par l'intermédiaire de TRAF2 et RIP, peuvent ainsi induire sous l'action du TNF α l'expression de gènes inflammatoires et celle de protéines d'adhérence des cellules endothéliales (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003).

La voie de l'apoptose : Le TNF α est connu pour induire l'apoptose de plusieurs types cellulaires. Cette voie passe principalement par le complexe TRADD/RIP/Fas-associated death domain (FADD) qui active la signalisation des Caspases conduisant à l'apoptose (Wang 2001). Une autre voie, indépendante de TRADD et passant par les seuls RIP et FADD, a été décrite. Cette voie, qui serait supprimée dans certains cancers, se poursuit par l'intermédiaire de la Caspase 8 pour aboutir à l'apoptose (Petersen, Wang et al. 2007).

3b. Le TNF α dans la perméabilité endothéliale

En plus d'être une cytokine inflammatoire, le TNF α est aussi un médiateur qui augmente la perméabilité endothéliale *in vivo* dans des poumons isolés et *in vitro* sur les cellules endothéliales en culture (Horvath, Ferro et al. 1988, Hocking, Phillips et al. 1990). Le TNF α est libéré de la surface des monocytes et macrophages activés dans les microcirculations, provoque une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire via TNFR-1 (Hocking, Phillips et al. 1990, Mamdouh, Chen et al. 2003). De plus le TNF α induit l'expression de protéines d'adhérence comme ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) et E-selectine permettant l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales (Mehta and Malik 2006). Il peut induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (les ROS pour reactive oxygen species) qui peuvent aussi participer à l'augmentation de la perméabilité endothéliale (Goldblum, Hennig et al. 1989).

L'importance de PKC α a été rapportée pour l'induction de la perméabilité par le TNF α (Holinstat, Mehta et al. 2003). L'activation de RhoA par PKC α pourrait servir d'intermédiaire à l'action du TNF α sur la perméabilité (Wójciak-Stothard, Potempa et al. 2001). En effet l'inhibition de RhoA empêche l'effet du TNF α sur la formation des fibres de stress, la rupture des jonctions adhérentes et l'augmentation de la perméabilité (Wójciak-Stothard, Entwistle et al. 1998). De nombreux travaux ont montré que le TNF α induit la perméabilité endothéliale par l'activation de la MAPK p38 qui entraîne le réarrangement des microtubules et la rupture des jonctions intercellulaires (Kierner, Weber et al. 2002). De plus, le TNF α a été montré pour induire la phosphorylation des protéines des jonctions adhérentes comme la VE-cadhérine par des kinases de la famille Src, provoquant un affaiblissement des jonctions et induisant une augmentation de la perméabilité (Angelini, Hyun et al. 2006). Le TNF α peut provoquer l'activation des gélatinases qui sont des métalloprotéases de la matrice extracellulaire ou MMP – pour matrix metalloproteases – et participent à la dégradation des protéines d'adhérences intercellulaires et cellule-matrice (Rotundo, Curtis et al. 2002). Toutes ces études suggèrent que l'effet du TNF α passe majoritairement par une augmentation de la perméabilité paracellulaire.

II.3.3.2 Stabilisateurs de la barrière endothéliale

Plusieurs médiateurs ont été identifiés pour leur capacité à diminuer la perméabilité endothéliale. Ces agents sont sécrétés en réponse à une augmentation initiale de la perméabilité afin de permettre le rétablissement de la fonction de barrière de l'endothélium (Gamble, Drew et al. 2000, Garcia, Liu et al.

2001). Nous allons évoquer l'effet de deux médiateurs majeurs dans la stabilisation de la barrière endothéliale.

II.3.3.2.1. *Angiopoietine-1*

L'angiopoietine-1 (Ang-1) est un important régulateur de la néovascularisation embryonnaire et post-natale comme le VEGF même s'ils ont des effets globalement opposés (Gale and Yancopoulos 1999). L'Ang-1 active son récepteur à activité tyrosine kinase Tie2 pour stabiliser les vaisseaux nouvellement formés sous l'action du VEGF pendant l'angiogénèse embryonnaire (Suri, Jones et al. 1996). L'Ang-1 tend à inverser l'effet du VEGF sur la perméabilité endothéliale *in vitro* et *in vivo*. Il inhibe aussi la perméabilité endothéliale induite par la thrombine, la bradykinine et l'histamine (Pizurki, Zhou et al. 2003, Wang, Pampou et al. 2004). Le mécanisme moléculaire par lequel Ang-1 inhibe l'augmentation de la perméabilité induite par d'autres facteurs est moins connu. Néanmoins certaines observations suggèrent que le facteur Ang-1 devrait agir en régulant le flux de calcium et l'organisation du cytosquelette d'actine par l'inhibition de RhoA (Gingras, Lamy et al. 2000, Jho, Mehta et al. 2005).

II.3.3.2.2. *Sphingosine-1-phosphate*

La libération de phospholipides par les plaquettes a été montrée à plusieurs reprises comme pouvant améliorer l'intégrité de l'endothélium vasculaire et sa fonction de barrière (Gimbrone, Aster et al. 1969, Alexander, Patton et al. 1998). Parmi ces phospholipides, la sphingosine-1-phosphate (S1P) a été montrée comme ayant un rôle unique dans sa capacité de protéger les vaisseaux et les maintenir intacts (Garcia, Liu et al. 2001, Dudek, Jacobson et al. 2004, Dudek, Camp et al. 2007, Zhao, Singleton et al. 2009). La S1P se lie à l'albumine plasmatique permettant aux cellules endothéliales d'être permanentement exposées à son effet protecteur (Yatomi, Ohmori et al. 2000). L'effet stabilisateur de S1P se fait par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G Edg-1, Edg-2 et Edg-3 (pour endothelial differentiation gene receptor 1, 2 et 3 respectivement) (McVerry and Garcia 2004).

Par l'activation de ces récepteurs, S1P atténue la perméabilité vasculaire et l'inflammation induites par le Lipopolysaccharide (LPS) (Peng, Hassoun et al. 2004). L'effecteur majeur de cette signalisation est Rac qui entraîne l'assemblage de l'actine cortical et des jonctions adhérentes suggérant que S1P agit en stabilisant les jonctions intercellulaires et évite la perméabilité paracellulaire (Garcia, Liu et al. 2001).

II.4 Régulation du trafic des leucocytes par l'endothélium

L'endothélium a aussi une importance capitale dans la régulation du trafic leucocytaire pour la défense de l'organisme. Cette capacité de l'endothélium à moduler la transmigration leucocytaire, varie fortement en fonction du type de vaisseaux et d'organe et requiert plusieurs étapes dont le roulement du

leucocyte à la surface endothéliale, son activation au site inflammatoire, l'arrêt et la transmigration proprement dite (Ley, Laudanna et al. 2007). Toutes ces étapes se déroulent presque exclusivement dans les veinules post-capillaires (voir Figure II.6) (Aird 2007).

II.4.1 Extravasation leucocytaire dans les veinules post-capillaires

Dans les conditions normales, les leucocytes circulent dans la partie centrale des vaisseaux où la vitesse est la plus importante. En cas d'inflammation, la vasodilatation ralentit le flux sanguin, ce qui permet aux leucocytes d'interagir avec l'endothélium. Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules à être recrutées sur le site infectieux. Les mécanismes d'extravasation ont été largement étudiés au niveau des veinules post-capillaires de la peau, du muscle, et du mésentère (voir Figure II.7A). 3 étapes principales peuvent être identifiées :

II.4.1.1 Roulement des leucocytes

La première étape comporte une phase de roulement des leucocytes qui passe par l'interaction de ligands glycoprotéiques des leucocytes avec les sélectines exprimées par l'endothélium activé, les P- (pour platelet) sélectine (CD62P) et E- (pour endothelial) sélectine (CD62E). La P-sélectine est exprimée par les cellules endothéliales mais aussi par les mégacaryocytes. Dans les conditions de quiescence (endothélium non activé), la P-sélectine est stockée dans les corps de Weibel-Palade des veinules post-capillaires (McEver, Beckstead et al. 1989). Chez la souris, son expression dans les poumons et le mésentère est plus forte que dans d'autres organes comme le cœur, le cerveau ou l'estomac. Au cours de l'inflammation, son expression est augmentée en quelques minutes, sous l'action de leucotriènes ou de l'histamine produite par les mastocytes et ce, dans presque tous les organes sauf le cerveau. La E-selectine est exprimée dans les seules cellules endothéliales activées sauf au niveau pulmonaire où elle est exprimée même sans activation de l'endothélium (Eppihimer, Wolitzky et al. 1996, Feuerhake, Füchsl et al. 1998). Dans l'inflammation, son expression est augmentée en quelques heures en réponse au TNF α ou au LPS (Yano, Liaw et al. 2006). Au total, les cytokines induisent l'expression des E- et P-sélectine à la surface endothéliale qui interagissent alors avec des glycoprotéines membranaires des leucocytes. Il s'agit d'une adhésion faible et réversible qui leur permet de rouler sur l'endothélium activé vers le site d'inflammation.

II.4.1.2 Activation et arrêt au site inflammatoire :

La deuxième étape correspond à l'arrêt des leucocytes par adhésion forte à l'endothélium. En effet, pendant le roulement, les leucocytes sont eux aussi activés par les cytokines en provenance du site inflammatoire qui conduit à l'expression des molécules d'adhérences nécessaires pour que la cellule immunitaire s'arrête au site inflammatoire et adhère fortement aux cellules endothéliales environnantes (Ley, Laudanna et al. 2007). L'adhésion forte entre leucocytes et cellules endothéliales se fait

par l'intermédiaire des intégrines ($\alpha_4\beta_7$, $\alpha_L\beta_2$ encore appelé LFA-1 pour lymphocyte function-associated antigen 1) du leucocyte et de la molécule ICAM-1 endothéliale ainsi que par l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ (aussi appelé VLA-4 pour very late antigen 4) du leucocyte et la protéine VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) de l'endothélium.

II.4.1.3 Transmigration leucocytaire :

Une fois arrêtés, les leucocytes franchissent la paroi endothéliale pour entrer dans les tissus (diapédèse) en passant soit entre les cellules endothéliales (voie paracellulaire), soit au travers de la cellule endothéliale (voie transcellulaire) (Ley, Laudanna et al. 2007).

La protéine PECAM (platelet/endothelial cell adhesion molecule) est exprimée à la surface des plaquettes et sur les cellules endothéliales et participe au sens de la transmigration car un gradient croissant de PECAM du pôle apical vers la base s'établit dans la jonction intercellulaire endothéliale orientant ainsi la migration du leucocyte (Muller, Weigl et al. 1993, DeLisser, Newman et al. 1994).

II.4.1.4 Passage de la membrane basale et des péricytes

Suite à la transmigration endothéliale, le leucocyte doit passer à travers la membrane basale et la couche de péricytes. Ce passage se ferait préférentiellement dans des zones où l'expression des composants de la membrane basale (collagène IV, laminine 10, nidogène-2) est réduite par rapport à l'expression moyenne retrouvée tout au long du vaisseau. Ces zones sont toujours associées à un trou

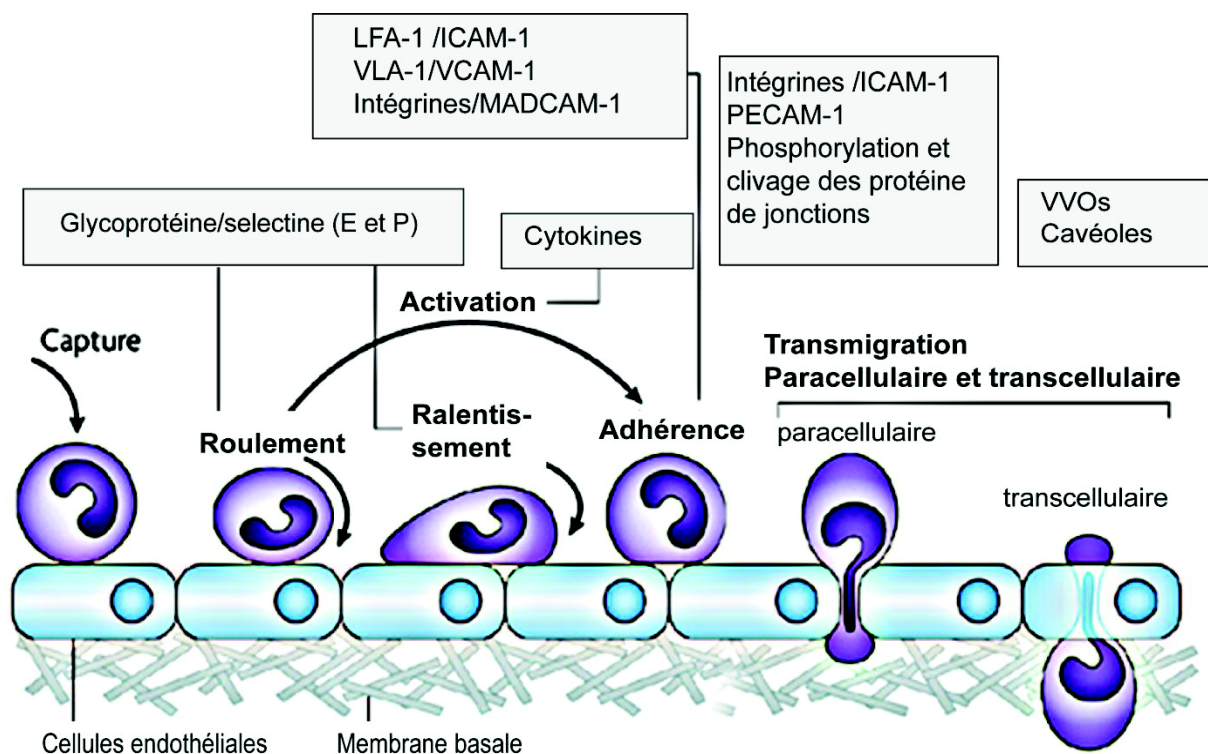


Figure II. 6 : Les différentes étapes du trafic leucocytaire dans les veinules post-capillaires, (modifiée d'après (Weis and Cheresh 2005)).

entre deux péricytes et sont en général localisées à côté des jonctions cellulaires endothéliales. Il y a également un remodelage de la membrane basale par des protéases, telles que l'élastase de neutrophile NE (*Neutrophil Elastase*) qui dégrade les constituants de la membrane basale.

II.4.2 Extravasation dans d'autres vaisseaux

L'extravasation leucocytaire se réalise au niveau des veinules post-capillaires mais le processus est aussi observé dans d'autres vaisseaux dont les grosses veines, les capillaires et les artérioles de plusieurs organes.

II.4.2.1 Dans les capillaires

Dans le poumon, le rôle de molécules pro-inflammatoires dans la physiopathologie respiratoire a été démontré au cours des trois dernières décennies. Dans le cas de réaction inflammatoire pulmonaire, la séquestration et la transmigration leucocytaire ont lieu dans les capillaires alvéolaires (Doerschuk 2001, Burns, Smith et al. 2003) (voir Figure II.7B). Par contre, dans le foie, environ 80% des leucocytes émigrent au niveau de l'endothélium sinusoidal des capillaires (voir Figure II.7C) (Wong, Johnston et al. 1997). L'extravasation leucocytaire dans les capillaires pulmonaires ou hépatiques ne nécessite pas d'étape de roulement donc est indépendant des E- et P-sélectine mais implique la protéine ICAM-1 (Wong, Johnston et al. 1997, Nishio, Suzuki et al. 1998).

II.4.2.2 Dans les artères et artérioles

Au niveau des artères et des artérioles, l'extravasation leucocytaire avec une étape de roulement peut être observée sous l'effet de cytokines inflammatoires telles que le TNF α ou l'interleukine-1 (IL-1) ou de certains facteurs extérieurs comme la nicotine. Dans ce cas les types de leucocytes sont différents entre artères et veines. Ainsi chez le rat, l'administration d'angiotensine II conduit à l'extravasation des monocytes et des lymphocytes dans les artérioles tandis que les neutrophiles passent à travers l'endothélium des veinules (Alvarez, Cerdá-Nicolás et al. 2004). Il y a donc une disparité dans l'extravasation leucocytaire selon les médiateurs inflammatoires, le type cellulaire, l'organe enflammé et le type de vaisseaux.

II.4.2.3 Dans les veinules à haut endothélium

Une autre forme de trafic leucocytaire, différente de celles décrites jusque-ici, a lieu dans certains organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques périphériques et mésentériques (voir Figure II.7D). Dans ces organes l'extravasation se fait à travers des veinules spécialisées appelées HEV (pour high endothelial venules) qui sont des veinules post-capillaires avec un endothélium cubique plus épais que la monocouche endothéliale des autres veinules du corps (von Andrian and Mempel 2003, Miyasaka and Tanaka 2004). Contrairement aux veinules post-capillaires non-lymphoïdes où l'extravasation leucocytaire a lieu pendant l'inflammation, les HEVs permettent une

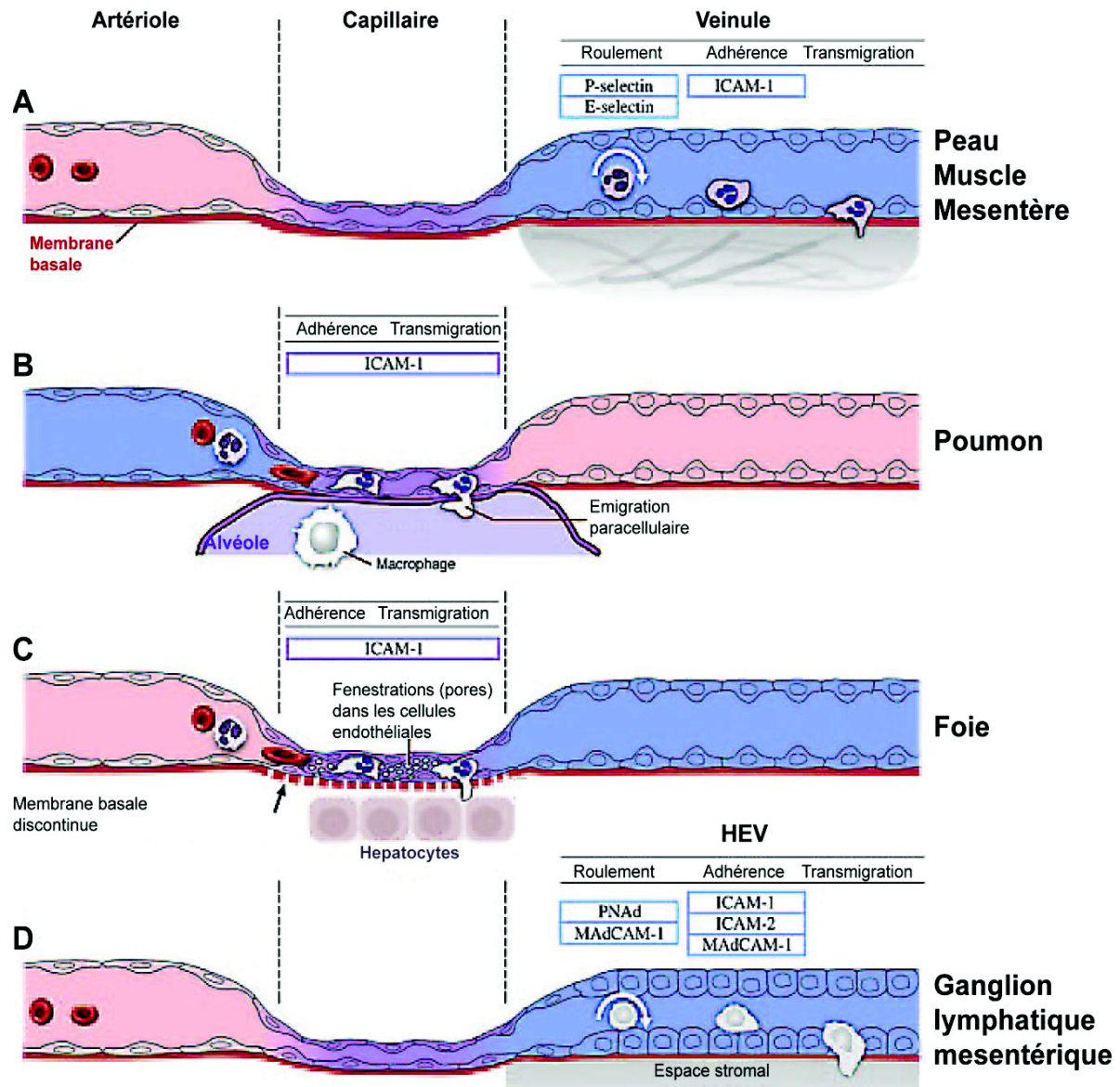


Figure II.7 : Endothélium vasculaire dans le trafic leucocytaire (modifiée d'après (Aird 2007)). A. la voie conventionnelle du trafic des leucocytes qui s'attachent, roulent, adhèrent et passent à travers l'endothélium activé des veinules ; ce processus a lieu dans la peau, les muscles ou le mé-sentère ; B. dans le poumon, la majorité du trafic leucocytaire se fait dans les capillaires par la voie paracellulaire ; C. dans le foie le trafic se fait principalement dans les capillaires à travers les pores de l'endothélium fenestré ; D. dans les veinules spécialisées des ganglions lymphatiques (HEV) du mé-sentère par exemple, les lymphocytes circulent continuellement entre le sang et les tissus grâce à l'expression de molécules d'adhérences spécifiques des HEV.

circulation constitutive et continue, des lymphocytes entre le sang et les ganglions lymphatiques. L'endothélium de ces vaisseaux exprime un répertoire unique de molécules d'adhérence impliquées dans l'extravasation lymphocytaire. Il y a trois étapes dans cette extravasation qui sont :

- Le roulement grâce l'interaction entre la L-sélectine du lymphocyte et son ligand endothélial PNAd (peripheral node addressin) ;
- L'activation des intégrines lymphocytaires ;
- La forte adhérence entre le lymphocyte et l'endothélium grâce à l'interaction entre les intégrines et l'ICAM-1, l'ICAM-2 et la MadCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule 1).

II.5 Endothélium et vasomotricité

Les cellules endothéliales, sous l'action de certains stimuli chimiques ou mécaniques, sécrètent plusieurs agents qui diffusent et agissent de façon paracrine sur le muscle lisse afin d'induire sa contraction ou son relâchement. Ceci conduit respectivement à la vasoconstriction ou à la vasodilatation (pour une revue plus complète voir (Vander 2001, Villar, Francis et al. 2006)).

Parmi les substances vasoactives synthétisées par l'endothélium, on peut citer les agents vasorelaxants tels que la Prostacycline PGI_2 synthétisée à partir de l'oxyde arachidonique par une prostacycline synthétase. La prostacycline provoque une vasorelaxation par une augmentation d'acide adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire. Les artères présentent un fort niveau de PGI_2 dû à la force exercée par le flux sanguin sur l'endothélium appelée « shear stress ».

Le monoxyde d'azote, anciennement dénommé EDRF (endothelium derived relaxing factor), puissant vasodilatateur synthétisé à partir de L-arginine par l'intermédiaire de la NO synthétase constitutive (type III). Le NO active la guanylate cyclase du muscle lisse, ce qui augmente la concentration de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et entraîne une relaxation en diminuant la quantité de calcium cytosplasmique libre. La production de NO est également sous la dépendance de contraintes mécaniques générées par un écoulement du sang appelé «forces de cisaillement» qui provoquent un étirement des cellules endothéliales et entraînent l'activation des canaux potassiques induisant une entrée de calcium dans la cellule endothéliale et donc la synthèse de NO. Le vaisseau est alors dilaté et les forces de cisaillement diminuent. Des quantités importantes de NO sont libérées de façon continue par les cellules endothéliales dans les artérioles, ainsi contribuent à la vasodilatation de base des artérioles et la diminution de leur résistance. En plus, la sécrétion de NO par les cellules endothéliales est fortement incrémentée par des médiateurs chimiques dans le contrôle local des artérioles. Par exemple, des facteurs inflammatoires comme l'histamine ou la bradykinine induisent une forte libération de NO par l'endothélium

Parmi les agents vasoconstricteurs, on peut citer l'endothéline, peptide de 21 AA synthétisé, à partir d'une pré-pro-endothéline (environ 200 AA), sous l'action de l'endothelin converting enzyme (ECE). Il existe trois types de récepteurs à l'endothéline (R-ET A, B et C) qui sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. La vasoconstriction est déclenchée suite à l'activation du récepteur R-ET A qui est exprimé à la surface des cellules musculaires lisses de la paroi des artères et la vasodilatation via le récepteur R-ET B qui est exprimé à la surface des cellules endo-

théliales. L'endothéline-1 (ET-1) est un important vasoconstricteur qui est aussi sécrété par les cellules endothéliales sous stimulation mécanique ou chimique dans les artérioles. L'augmentation du shear stress diminue la libération d'ET-1 dans les artères et conduit à la vasodilatation. La sécrétion des vasoconstricteurs ou vasodilatateurs par les cellules endothéliales des veines est très différente de celle des artères étant donné que les cellules endothéliales des veines sont soumises à de très faible shear stress. De tous les vaisseaux sanguins, la vasomotricité est principalement modulée par l'activité de l'endothélium des artérioles.

II.6 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons pu noter l'importance de l'endothélium et le caractère crucial de son rôle dans de nombreux processus modulant l'homéostasie des vaisseaux sanguins :

- Tout d'abord dans le développement vasculaire avec la formation des structures endothéliales primaires qui, par leurs réponses aux facteurs environnants ou leurs propres sécrétions, vont subir des remodelages angiogéniques ainsi que des différenciations en veines ou artères.
- Ensuite, dans la plupart des fonctions du système cardiovasculaire où il module la perméabilité vasculaire (basale et induite), il régule le trafic des leucocytes entre le sang et les tissus périphériques pour une défense efficace contre les corps étrangers et il agit sur la vasomotricité pour augmenter ou diminuer le flux sanguin dans un organe ou de façon systémique.

La plupart de ces paramètres sont le résultat de modifications de la fonction de barrière endothéliale portant sur les structures intercellulaires qui assurent la cohésion des cellules endothéliales et l'intégrité de l'endothélium. Nous allons donc voir dans le prochain chapitre le rôle spécifique de ces structures intercellulaires que sont les jonctions endothéliales et par là évaluer leurs importances dans les fonctions de l'endothélium dans l'homéostasie vasculaire.

Chapitre III: Intégrité et cohésion de l'endothélium

Sommaire

CHAPITRE III: INTEGRITE ET LA COHESION DE L'ENDOTHELIUM.....	63
III.1 Généralité sur les jonctions endothéliales.....	63
III.2 Les jonctions endothéliales.....	64
III.2.1 Jonctions serrées	64
III.2.2 Jonctions adhérentes	69
III.3 Rôle de la VE-cadhérine dans la fonction et l'intégrité de l'endothélium.....	82
III.3.1 VE-cadhérine dans l'angiogenèse	82
III.3.2 Inhibition de la prolifération cellulaire.....	83
III.3.3 VE-cadhérine et survie cellulaire induite par le VEGF	86
III.3.4 VE-cadhérine et force hémodynamique.....	86
III.3.5 Contrôle des jonctions serrées.....	86
III.3.6 Modulation de la force des jonctions intercellulaires par la VE-cadhérine	87
III.4 Conclusion.....	94

III.1 Généralité sur les jonctions endothéliales

Les cellules endothéliales ont comme caractéristique majeure de contrôler l'infiltration des cellules et protéines du sang dans la paroi vasculaire et les tissus sous-jacents. Cette propriété est principalement assurée par l'ouverture et la fermeture coordonnées des jonctions endothéliales dont l'organisation est essentielle dans l'homéostasie vasculaire. En effet, différentes pathologies sont associées à un défaut d'organisation des jonctions endothéliales. Elles sont composées de protéines adhésives transmembranaires assurant par leurs domaines extracellulaires des liaisons homophiliques et par leurs domaines cytoplasmiques des liaisons au réseau d'actine par l'intermédiaire de protéines régulatrices assurant ainsi une forte cohésion du tapis cellulaire endothélial (Wallez and Huber 2008, Dejana and Giampietro 2012). Quatre types de jonctions endothéliales permettent de maintenir l'intégrité du système vasculaire: les jonctions étanches ou serrées, les jonctions adhérentes (Figure III.1), les syndesmos, et les jonctions de communication. Bien que les protéines constitutives et les fonctions de ces jonctions soient différentes, leur organisation générale est semblable. Elles se distinguent par leurs constituants protéiques majeurs, VE-cadherine, claudine-5, connexine (Xavier F. Figueroa, Figueroa et al. 2009). L'abondance de l'une ou l'autre de ces types de jonctions détermine le type d'endothélium dans un vaisseau donné (voir la description des capillaires au chapitre I). Dans ce chapitre, sera discutée l'importance du rôle joué par les jonctions endothéliales et leurs composants dans la modulation de la

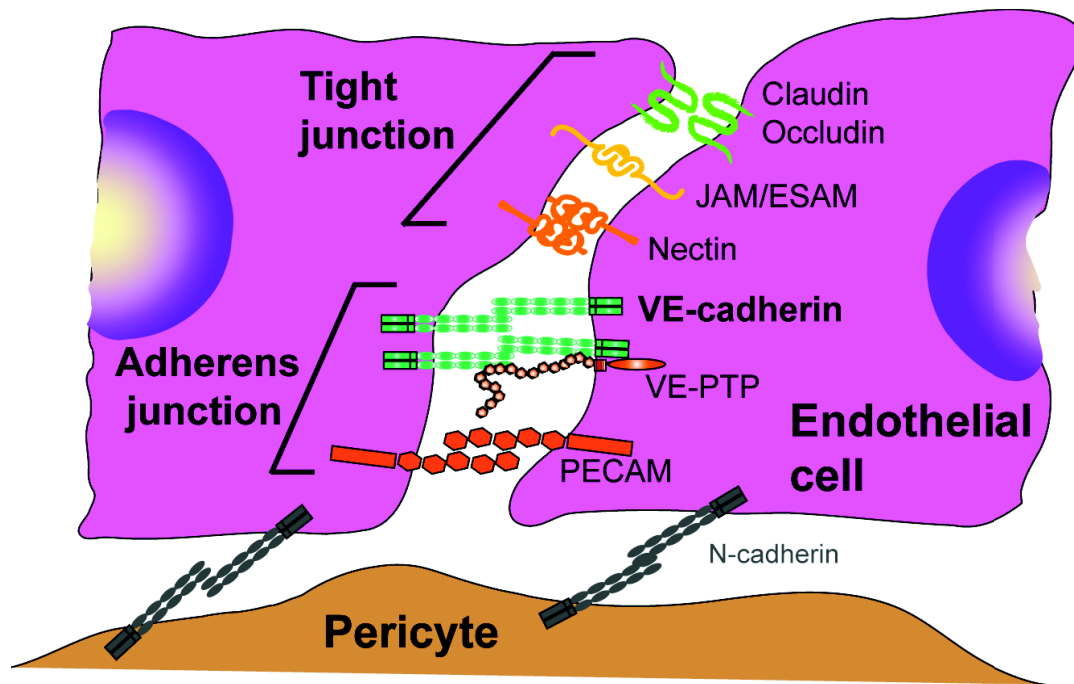


Figure III.1: Protéines des jonctions serrées et adhérentes de l'endothélium

fonction de l'endothélium. Le rôle spécifique de la VE-cadhérine dans l'intégrité de l'endothélium et la physiologie vasculaire sera particulièrement discuté.

III.2 Les jonctions endothéliales

De façon analogue aux cellules épithéliales, les cellules endothéliales assurent leur cohésion cellulaire par l'intermédiaire de structures moléculaires situées aux contacts intercellulaires endothéliaux.

Il existe quatre types de jonctions endothéliales : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes (Figure III.1), les complexes adhérents ou syndesmo et les jonctions gap (Schmelz and Franke 1993, Schmelz, Moll et al. 1994). Ces structures jonctionnelles sont formées de protéines transmembranaires responsables de l'adhésion homotypique ou de la communication intercellulaire. Ces protéines transmembranaires lient des partenaires cytoplasmiques spécifiques qui les ancrent au cytosquelette d'actine ou aux filaments intermédiaires, stabilisant ainsi la jonction.

III.2.1 Jonctions serrées

III.2.1.1 Définition

Les jonctions serrées ou *zonula occludens* (pour jonction d'occlusion) sont des structures spécialisées des contacts intercellulaires qui forment une zone de forte adhérence dont le rôle principal est de servir de barrière quasi-imperméable à la diffusion paracellulaire en gardant la polarité des cellules et per-

mettant une perméabilité endothéliale hautement sélective (van Meer and Simons 1986, Cereijido, Valdés et al. 1998).

Le contact entre deux cellules adjacentes, au niveau des jonctions serrées, est d'une telle étroitesse qu'il était considéré initialement comme une région de fusion entre les couches externes de la membrane plasmique de ces deux cellules (Anderson and Van Itallie 2009). La plupart des données disponibles sur les jonctions serrées ont été acquises avec les cellules épithéliales. Mais leur forte ressemblance avec les cellules endothéliales, a conduit à faire une extrapolation de ces données pour expliquer la fonction de ces jonctions dans l'endothélium bien que celui-ci présente quelques spécificités d'ordre moléculaire. La microscopie électronique à balayage d'un contact intercellulaire après cryofracture a permis de montrer que les jonctions serrées n'étaient pas des structures continues, mais plutôt des structures présentant deux membranes contigües fortement liées (voir Figure III.2).

III.2.1.2 Composition protéique

Les jonctions serrées sont principalement composées de trois familles de protéines : l'occludine (latin *occludere* = enfermer), les **claudines** (latin *claudere* = fermer) et les JAM (junctional adhesion molecule), (Furuse, Hirase et al. 1993, Furuse, Fujita et al. 1998, Martin-Padura, Lostaglio et al. 1998). Toutes ces familles de protéines présentent des interactions homophiliques ou hétérophiliques (avec d'autres sous-types de la même famille) (Furuse and Tsukita 2006). Cependant une quarantaine d'autres protéines sont retrouvées également aux jonctions serrées (Schneeberger and Lynch 2004, Chiba, Osanai et al. 2008, Yamazaki, Okawa et al. 2008), ce qui leur confère une composition protéique très complexe qui pourrait expliquer leur implication dans de nombreux processus cellulaires comme la polarité, la signalisation, la régulation de la transcription, le cycle cellulaire et le trafic vésiculaire, en plus de son rôle dans l'étanchéité de l'endothélium (Cereijido, Valdés et al. 1998, Yeaman, Grindstaff et al. 2004, González-Mariscal, Tapia et al. 2008, Van Itallie, Holmes et al. 2008).

III.2.1.2.1. *Claudines*

1a. *Structure des claudines*

Les claudines sont des protéines avec quatre domaines transmembranaires et deux domaines extracellulaires formant une grande boucle et une petite. La première boucle compte en moyenne 53 acides aminés (a.a.) et la seconde 24. L'extrémité N-terminale est en règle générale très courte (4 à 10 a.a.), l'extrémité C-terminale est très variable (de 21 à 63). La première boucle comporte un motif d'acides aminés contenant des résidus cystéine pouvant faire des ponts disulfures au sein de la boucle. Jusqu'à la claudine 12, toutes les claudines humaines possèdent côté C-terminal un domaine de reconnaissance de motif PDZ, interagissant de protéines intracellulaires comme les protéines ZO-1, -2 et -3 (pour zonula occludens), qui à leur tour sont liées au cytosquelette d'actine déterminant la localisation de la jonction au domaine apical de la cellule. (Bazzoni and Dejana 2004, Chiba, Osanai et al. 2008). Jusqu'à présent, il a été identifié chez l'homme 24 types de claudines, désignées claudine 1, ... claudine 24

1b. Claudines endothéliales

1b.a. Fonction

La claudine-5 est spécifiquement et très fortement exprimée dans les cellules endothéliales et tout particulièrement dans la barrière hématoencéphalique (Morita, Sasaki et al. 2003, Bazzoni and Dejana 2004). Elle est impliquée dans le contrôle de la perméabilité endothéliale et sert de canaux à certaines molécules (Bazzoni 2006). Son invalidation génique chez la souris entraîne une altération de la barrière hématoencéphalique laissant passer des molécules de moins 800 Da (Nitta, Hata et al. 2003). Ce phénotype partiel est dû à une compensation de l'absence de la claudine-5 par l'expression d'autres claudines notamment les claudine-3 et -11 (Wolburg, Wolburg-Buchholz et al. 2003).

1b.b. Régulation

Leur fonction de régulation de la perméabilité peut être modifiée par des processus de phosphorylation sur serine/thréonine, en particulier de la claudine-5 et de ses partenaires cytoplasmiques ZO-1 et ZO-2

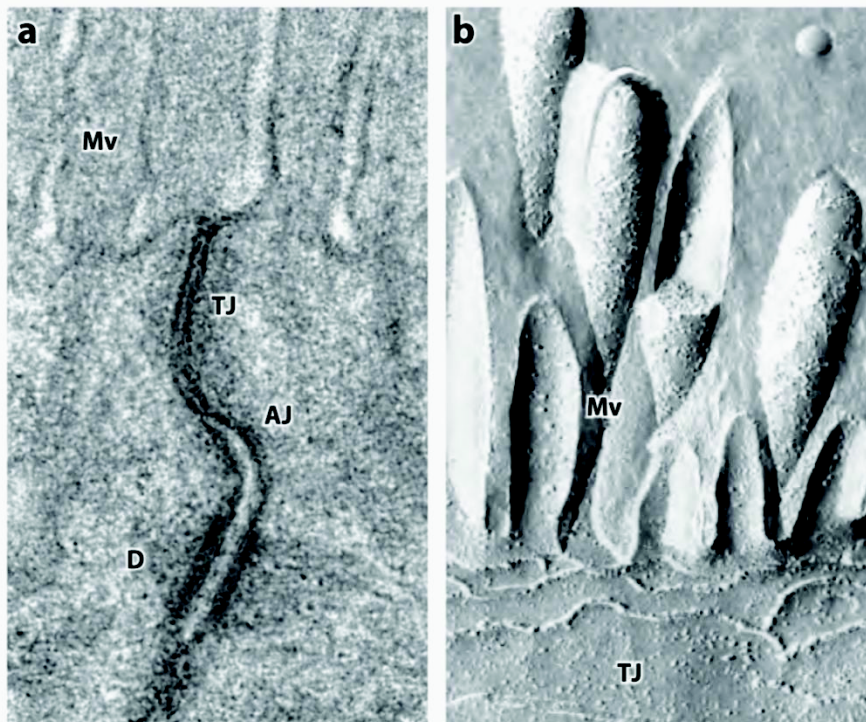


Figure III.2: Ultrastructure des jonctions épithéliales (d'après (Shen, Weber et al. 2011)). (a) Image d'une microscopie électronique à transmission montrant les jonctions serrées (TJ), adhérentes (AJ) et un desmosome (D) établis entre deux enterocytes. La jonction serrée se trouve au pôle apical, au dessous des microvillosités (Mv) et elle est suivie par une jonction adhérente. Les desmosomes sont localisés vers la base du contact intercellulaire. (b) Microscopie électronique à balayage de la surface d'une cryofracture d'un contact intercellulaire de cellules épithéliales.

sous l'action de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (Stamatovic, Dimitrijevic et al. 2006). La diminution de leur expression est aussi une cause de modification des fonctions de la barrière hématoencéphalique observée dans certaines pathologies indiquant qu'elles pourraient être des cibles thérapeutiques intéressantes (Harhaj and Antonetti 2004).

III.2.1.2.2. *Occludine*

2a. *Structure et fonction*

L'occludine est le premier composant des jonctions serrées à être identifié (Furuse, Hirase et al. 1993). Comme les claudines, c'est une protéine à quatre domaines transmembranaires qui interagit de façon homophile. Tout comme les claudines, elle est très fortement exprimée au niveau de la barrière hématoencéphalique et impliquée dans l'adhérence intercellulaire (Hirase, Staddon et al. 1997, Hori, Ohtsuki et al. 2004). Cependant son invalidation génique n'affecte ni l'organisation des jonctions ni la perméabilité vasculaire (Saitou, Furuse et al. 2000).

2b. *Régulation*

La fonction de l'occludine peut être régulée par protéolyse nécessitant uPA (urokinase plasminogen activator) ou les métalloprotéases sous l'action de cytokine ou pendant la transmigration leucocytaire (Wachtel, Frei et al. 1999, Behzadian, Windsor et al. 2003, Reijerkerk, Kooij et al. 2006). Sa fonction peut aussi être régulée par phosphorylation sur serine/thréonine par la PKC (protein kinase C) entraînant une augmentation de la perméabilité (Antonetti, Barber et al. 1999, Harhaj, Felinski et al. 2006).

III.2.1.2.3. *JAMs (junctional adhesion molecules)*

3a. *Structure*

Les JAMs, protéines d'un poids moléculaire de 33 kDa à un seul domaine transmembranaire appartiennent à la superfamille des immunoglobulines localisées aux jonctions serrées (Muller 2003). Il y a JAM-A, -B et -C qui présentent des différences dans leurs rôles, leurs sites d'expression et les cellules qui les expriment. Les JAMs sont des molécules d'adhérence cellulaire, qui interagissent de façon homophile (entre deux molécules de même type) et hétérophilique (entre les différentes JAMs et entre certaines JAMs et les intégrines). Il y a un autre membre de la famille des JAMs appelé ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule) qui présente les mêmes modes d'interaction.

3b. *Expression*

JAM-A est présente aux jonctions des cellules endothéliales et épithéliales, mais aussi à la surface des leucocytes et des plaquettes. JAM-C, aussi appelée VE-JAM (vascular endothelial junctional adhesion molecule), est exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques, mais aussi par les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et à la surface des leucocytes (Martin-Padura, Lostaglio et al. 1998, Williams, Martin-Padura et al. 1999). JAM-B est aussi exprimée dans les jonctions intercel-

lulaires endothéliales surtout dans les HEV des ganglions lymphatiques où elle est impliquée dans la migration transendothéliale des lymphocytes (Morris, Tawil et al. 2006, Ody, Jungblut-Ruault et al. 2007).

3c. *Fonctions*

Les JAMs participent à la régulation de la perméabilité, à l'extravasation des leucocytes, à l'angiogenèse, à la polarité baso-apical et la migration des cellules tumorales (Ozaki, Ishii et al. 1999, Johnson-Léger, Aurrand-Lions et al. 2002, Ebnet, Aurrand-Lions et al. 2003, Cera, Del Prete et al. 2004, Khandoga, Kessler et al. 2005, Nourshargh, Krombach et al. 2006, Bradfield, Scheiermann et al. 2007, Tenan, Aurrand-Lions et al. 2010).

En plus de leurs interactions homophiliques :

- JAM-A interagit avec l'intégrine $\alpha_L\beta_2$ exprimée à la surface des leucocytes pour faciliter l'adhérence des leucocytes à l'endothélium (Ostermann, Weber et al. 2002) ;
- JAM-B interagit avec l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ ou VLA-4 (pour very late antigen-4) des lymphocytes et participer au processus de roulement et d'adhérence des leucocytes à l'endothélium (Johnson-Léger, Aurrand-Lions et al. 2002) ;
- JAM-C interagit avec l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ pendant la transmigration des neutrophiles et interagit avec JAM-B pour renforcer les jonctions intercellulaires (Aurrand-Lions, Duncan et al. 2001, Lamagna, Meda et al. 2005).

III.2.1.2.4. *Nectines*

4a. *Structure*

Les nectines forment une autre famille de molécules d'adhérence intercellulaire appartenant à la super-famille des immunoglobulines (Irie, Shimizu et al. 2004, Nakanishi and Takai 2004, Ogita and Takai 2006). Quatre membres de cette famille de protéines (nectine-1 à 4) ont été décrits ainsi que cinq protéines reliées aux nectines appelées Necl-1 à 5 (pour nectin like protein 1-5). Les nectines font des interactions homophiliques ou hétérophiliques entre elles avec leurs domaines extracellulaires et s'associent via leur domaine C-terminal cytoplasmique à l'afadine/AF6, une protéine qui se lie aux filaments d'actine. Les complexes nectines/afadine s'associent aux protéines des jonctions serrées et adhérentes (Ogita and Takai 2006).

4b. *Fonction*

Elles participent à l'étape d'initiation de la formation des jonctions et participeraient à la dissémination virale et à la transmigration des leucocytes (Takai, Irie et al. 2003, Irie, Shimizu et al. 2004, Ogita, Rikitake et al. 2010).

III.2.2 Jonctions adhérentes

III.2.2.1 Définition

Les jonctions adhérentes ou *zonula adherens* sont des structures intercellulaires moins jointives et plus flexibles que les jonctions serrées (voir Figure III.2) permettant ainsi plus d'échanges entre le sang et les tissus sous-jacents. Les jonctions adhérentes sont composées majoritairement de glycoprotéines transmembranaires de la famille des cadhérines dont l'activité d'adhérence intercellulaire nécessite du calcium. Leur principal représentant dans les jonctions adhérentes endothéliales est une cadhérine spécifique de l'endothélium vasculaire appelée VE-cadhérine (pour vascular endothelial cadherin) ou cadhérine-5 ou CD144. La VE-cadhérine, établit des liens avec les protéines cytoplasmiques telles que

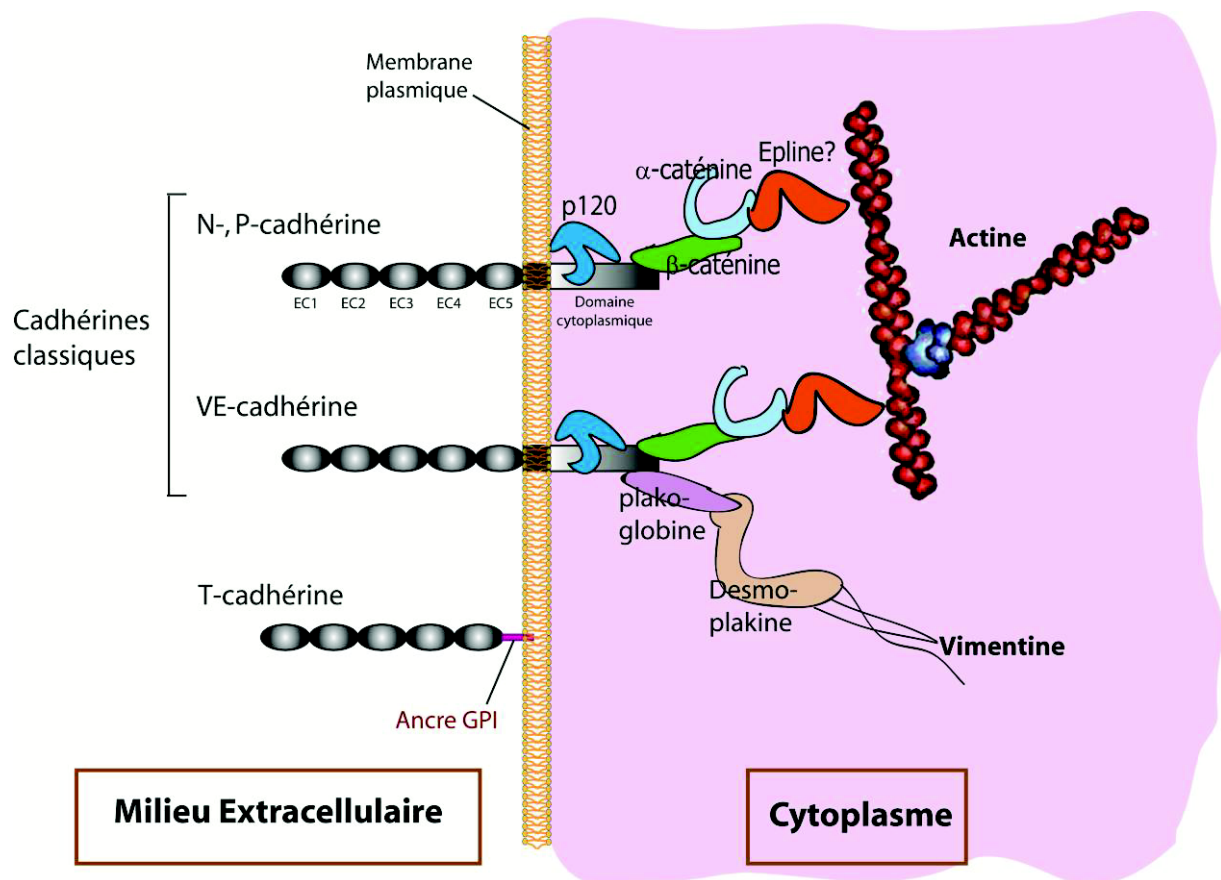


Figure III.3: Cadhérines endothéliales et caténines dans l'organisation des jonctions adhérentes. Les caténines font le lien entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine ou les filaments intermédiaires de vimentine. Bien que la protéine Eplaine fasse le lien entre l'α-caténine et l'actine pour les jonctions adhérentes faites de VE-cadhérine, la participation d'Eplaine dans les jonctions faites de N- ou de P-cadhérine n'est pas connue. L'élimination de la β-caténine entraîne son remplacement par la plakoglobine et favorise l'interaction des jonctions avec les filaments intermédiaires au détriment du réseau d'actine.

les caténines, elles-mêmes associées au cytosquelette d'actine. Le complexe supramoléculaire de la jonction adhérente comporte également d'autres types de protéines, comme les récepteurs à activité kinase pour tyrosine, des kinases et des phosphatases cytoplasmiques impliquées dans la régulation de l'organisation des jonctions au cours du remodelage de l'endothélium, participant ainsi à la transduction des signaux impliqués dans la survie, l'apoptose, la prolifération, la migration et la perméabilité endothéliale.

III.2.2.2 Cadhérines endothéliales

Les cellules endothéliales expriment principalement deux cadhérines qui sont la VE-cadhérine et la N-cadhérine (cadhérine neuronale exprimée par les cellules nerveuses et les cellules musculaires lisses aussi) (Dejana, Orsenigo et al. 2008). D'autres cadhérines moins spécifiques comme la T-cadhérine, composée du seul domaine extracellulaire relié à une ancre GPI, ou la P-cadhérine (placental cadherin) sont variablement exprimées dans différents types de cellules endothéliales (Ivanov, Philippova et al. 2001). La Figure III.3 présente les différentes cadhérines exprimées dans l'endothélium et leur position dans l'organisation des jonctions.

III.2.2.2.1. Structure des cadhérines endothéliales

Les cadhérines endothéliales sont des glycoprotéines transmembranaires de poids moléculaire apparent d'environ 130 kDa et dont la structure comporte trois parties (Shapiro and Weis 2009) :

- **Un domaine extracellulaire** commun aux cadhérines dites classiques (N-, P- ou VE-cadhérine) formé de 5 domaines cadhérines (EC) ressemblant au motif immunoglobuline. Ces domaines cadhérine extracellulaires sont numérotés, à partir de l'extrémité N-terminal, d'EC1 à EC5. Ces domaines cadhérine ont chacun des sites de fixation du calcium nécessaire pour leur interaction homophile (Angst, Marcozzi et al. 2001). La structure du domaine extracellulaire de plusieurs cadhérines dont la E-cadhérine a été résolue mais leur mode d'interaction reste assez débattu (Angst, Marcozzi et al. 2001). Cependant le modèle d'interaction le plus répandu qui explique bien la fonction des cadhérines est celui de la fermeture éclair faite avec des dimères de cadhérines (Shapiro, Fannon et al. 1995). D'autres modèles d'interactions ont été proposés comme le modèle hexamérique pour la VE-cadhérine (Bibert, Jaquinod et al. 2002, Bibert, Ayari et al. 2008).
- **Une partie transmembranaire** qui est généralement un seul domaine pour la majorité des cadhérines. La cadhérine tronquée, ou T-cadhérine, fait exception et n'a pas de domaine transmembranaire mais a plutôt une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI).
- **Une partie cytoplasmique** qui peut se lier à de nombreux complexes cytoplasmiques dont les caténines qui assurent la liaison avec le cytosquelette d'actine.

III.2.2.2.2. *La VE-cadhérine/cadhérine-5*

2a. *Structure*

La VE-cadhérine, découverte en 1991 par Suzuki et al, a été identifiée comme étant spécifique des cellules endothéliales (Suzuki, Sano et al. 1991, Lampugnani, Resnati et al. 1992). Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type I de 125 kDa, de 784 acides aminés chez l'Homme.

- **Domaine extracellulaire :** Son domaine extracellulaire comporte 552 acides aminés et est formé de cinq modules cadhérine (EC1 à 5) d'une centaine d'acides aminés chacun. Les domaines EC1 à EC4 sont composés de structures en feuillet β . Le domaine EC5, le plus proche de la membrane, comprend quatre résidus cystéine à l'origine de deux ponts disulfures. Les sites de fixation du calcium sont situés au niveau du domaine extracellulaire plus particulièrement dans les régions inter-modulaires et la saturation de ces sites pourrait être à l'origine de la rigidité du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine par formation de multimères de VE-cadhérine. Elle n'assure que des contacts homotypiques entre deux cellules endothéliales (Dejana, Corada et al. 1995) en engageant des interactions homophiliques en cis avec d'autres molécules de VE-cadhérine de la même cellule et en trans avec des molécules de VE-cadhérine de la cellule adjacente.

- **Domaine cytoplasmique :** Composé de 164 a.a. chez l'Homme, le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine se lie à la caténine p120, la β -caténine et à la plakoglobine (dans les syndesmo ou complexus adhérents) qui elles-mêmes lient l' α -caténine qui s'associe à l'actine via l'EPLINE (epithelial protein lost In neoplasm) (Chervin-Pétinot, Courçon et al. 2012). D'autres protéines sont associées dans la partie cytoplasmique de la cellule endothéliale. Parmi ces protéines il y a l' α -actinine, la vinculine ou encore la ZO-1 (Weis and Nelson 2006). Le complexe de VE-cadhérine influence et est influencé par le cytosquelette d'actine, mais les mécanismes moléculaires de ces interactions restent peu clairs. Il était accepté que l' α -caténine fasse le lien entre le complexe de VE-cadhérine et les filaments d'actine, mais il a été montré par la suite que l' α -caténine ne peut pas se lier simultanément à la β -caténine et à l'actine (Weis and Nelson 2006). Au laboratoire, Chervin-Pétino et al ont récemment montré que la protéine epline fait le lien entre le complexe de VE-cadhérine et les filaments d'actine et permet la stabilisation du complexe ainsi que celle de la jonction adhérente (Chervin-Pétinot, Courçon et al. 2012). Cette association du complexe de VE-cadhérine avec l'actine est cruciale pour le contrôle de la perméabilité. En effet, l'expression d'une forme mutante de VE-cadhérine tronquée dans son domaine cytoplasmique responsable de la fixation de la β -caténine dans les cellules endothéliales leur confère des jonctions caractérisées par des forces d'interaction plus faibles qu'avec la protéine entière bien qu'elle puisse toujours s'engager dans les interactions homophiliques (Navarro, Caveda et al. 1995). Le même type de mutation réalisé chez la souris conduit à un phénotype létal à cause d'une altération de l'angiogenèse embryonnaire comparable à celui observé dans l'inactivation du gène entier (Carmeliet, Lampugnani et al. 1999). L'interaction de la VE-cadhérine avec le cytosquelette d'actine est nécessaire pour le maintien de l'intégrité de l'endothélium.

2b. Rôle de la VE-cadhérine :

Elle joue un rôle primordial dans le développement vasculaire. En effet son invalidation génique chez la souris a montré une létalité à 11,5 jours de gestation par défaut d'angiogenèse embryonnaire (Gory-Faure, Prandini et al. 1999). A l'âge adulte, la VE-cadhérine est nécessaire pour l'intégrité de l'endothélium vasculaire. Il a été montré que l'administration d'anticorps spécifique du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine, est responsable d'une forte augmentation de la perméabilité vasculaire et des hémorragies dues à une fragilisation des vaisseaux (Corada, Mariotti et al. 1999).

En plus de son rôle dans le maintien de l'intégrité, la VE-cadhérine participe à la signalisation intracellulaire par l'intermédiaire de ses partenaires cytoplasmiques tels que la β -caténine ou encore les kinases de la famille Src. La VE-cadhérine est ainsi impliquée dans la régulation de la transmigration des leucocytes, la migration, la survie et la prolifération des cellules endothéliales (Wallez and Huber 2008). Elle occupe donc une place importante dans les processus inflammatoires et pendant l'angiogenèse. En effet, les médiateurs de la perméabilité vasculaire comme l'histamine, le VEGF, le TNF α ou la thrombine induisent des effets modérés et réversibles sur la perméabilité endothéliale en modifiant les propriétés adhésives de la VE-cadhérine.

III.2.2.2.3. N-cadhérine

3a. Expression

La N-cadhérine exprimée au niveau neuronal, l'est également dans les cellules endothéliales. Dans ces cellules, sa distribution est différente de celle de la VE-cadhérine, en effet elle est très faiblement trouvée aux jonctions intercellulaires et des travaux antérieurs ont montré que la présence de la VE-cadhérine aux jonctions exclut la N-cadhérine de ces jonctions (Navarro, Ruco et al. 1998). Le rôle de la N-cadhérine a été démontré par invalidation génique chez la souris qui entraîne un phénotype létal similaire à celui de l'inactivation du gène de la VE-cadhérine. In vitro, la sous expression de la N-cadhérine conduit à une inhibition post-transcriptionnelle de l'expression de la VE-cadhérine, pouvant ainsi expliquer ce phénotype drastique observé (Luo and Radice 2005). Le processus moléculaire impliqué, dans la différence de site d'expression entre la VE-cadhérine et la N-cadhérine, a été étudié au laboratoire montrant que la caténine p120 occupe une place importante dans l'exclusion de la N-cadhérine des jonctions adhérentes (Gentil-dit-Maurin, Oun et al. 2010).

3b. Rôle de la N-cadhérine

Dans une monocouche de cellules endothéliales, la N-cadhérine ne semble pas jouer de rôle dans la jonction intercellulaire mais a plutôt un rôle dans les contacts hétérotypiques entre cellules endothéliales et cellules murales comme les péricytes ou encore les cellules musculaires lisses via des interactions homophiliques entre molécules de N-cadhérine (Gerhardt, Wolburg et al. 2000, Paik, Skoura et al. 2004). Donc le rôle principal de la N-cadhérine dans l'endothélium est le recrutement des cellules murales pour la stabilisation des vaisseaux (Cavallaro, Liebner et al. 2006). En effet, la déficience des

cellules endothéliales en N-cadhérine entraîne une diminution significative de la couverture péricytaire dans les phases tardives de l'angiogenèse (Tillet, Vittet et al. 2005). Dans le cancer, l'expression de la N-cadhérine par les cellules tumorales qui ont perdu l'expression de la E-cadhérine (pour epithelial cadherin) serait un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse et pourrait être impliquée dans la transmigration des cellules tumorales et ainsi participer au processus métastatique (Islam, Carey et al. 1996, Sandig, Voura et al. 1997, Qi, Wang et al. 2006).

III.2.2.3 Caténines

Ozawa et al ont découvert en 1989 trois partenaires de la E-cadhérine, qui ont été ensuite dénommés α -, β - et γ -caténine (Ozawa, Baribault et al. 1989, Ozawa and Kemler 1992). Les caténines sont importantes pour la régulation de la fonction des cadhérines. En effet, l'invalidation génique des caténines empêche les cadhérines de constituer des jonctions intercellulaires fortes (Vincent, Xiao et al. 2004) qui ne peuvent plus être liées au cytosquelette d'actine d'où une instabilité des jonctions et des conséquences dramatiques sur l'intégrité et la fonction des vaisseaux (Dejana and Giampietro 2012). Les caténines des jonctions adhérentes sont la caténine p120, la β -caténine, l' α -caténine et la γ -caténine encore appelée plakoglobine. Elles ont des implications différentes dans la cellule endothéliale et dans l'homéostasie vasculaire.

III.2.2.3.1. β -caténine et la γ -caténine

Protéines d'environ 120 kDa qui font partie des protéines de la famille Armadillo (analogue chez la drosophile) caractérisées par la présence d'un motif répété de 42 acides aminés qui sert d'ancrage à plusieurs protéines cytoplasmiques (Riggelman, Wieschaus et al. 1989). Au plan moléculaire, la β -caténine fait le pont entre le domaine cytoplasmique des cadhérines et l' α -caténine (Aberle, Butz et al. 1994). La γ -caténine qui a été identifiée comme étant la plakoglobine des desmosomes, a des fonctions similaires à celles de la β -caténine (Knudsen and Wheelock 1992). La plakoglobine s'associe à l' α -caténine dans les jonctions adhérentes et à la desmoplakine dans les complexus adhérents (Vincent, Xiao et al. 2004). Toutes ces interactions favorisent le lien au cytosquelette et la force de tension de la jonction intercellulaire endothéliale. La Figure III.3 montre les interactions aux jonctions adhérentes des caténines avec les cadhérines endothéliales et le cytosquelette.

1a. β -caténine et γ -caténine dans la stabilité des jonctions

La stabilité des jonctions intercellulaires endothéliales repose sur le complexe VE-cadhérine- β -caténine. L'analyse de ce complexe a montré qu'en absence de la β -caténine, le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine est déstructuré et devient sensible à la dégradation (Huber, Stewart et al. 2001, Huber and Weis 2001). L'inactivation génique conditionnelle de la β -caténine des cellules endothéliales, a entraîné le recrutement de la plakoglobine aux jonctions qui se lie à la desmoplakine (une autre protéine des desmosomes) pour former plus de complexus adhérents (Cattellino, Liebner et al. 2003). Cela semble être un moyen de compensation mis en place par les cellules endothéliales pour at-

Régulation de la β -caténine par la voie Wnt/Frizzled

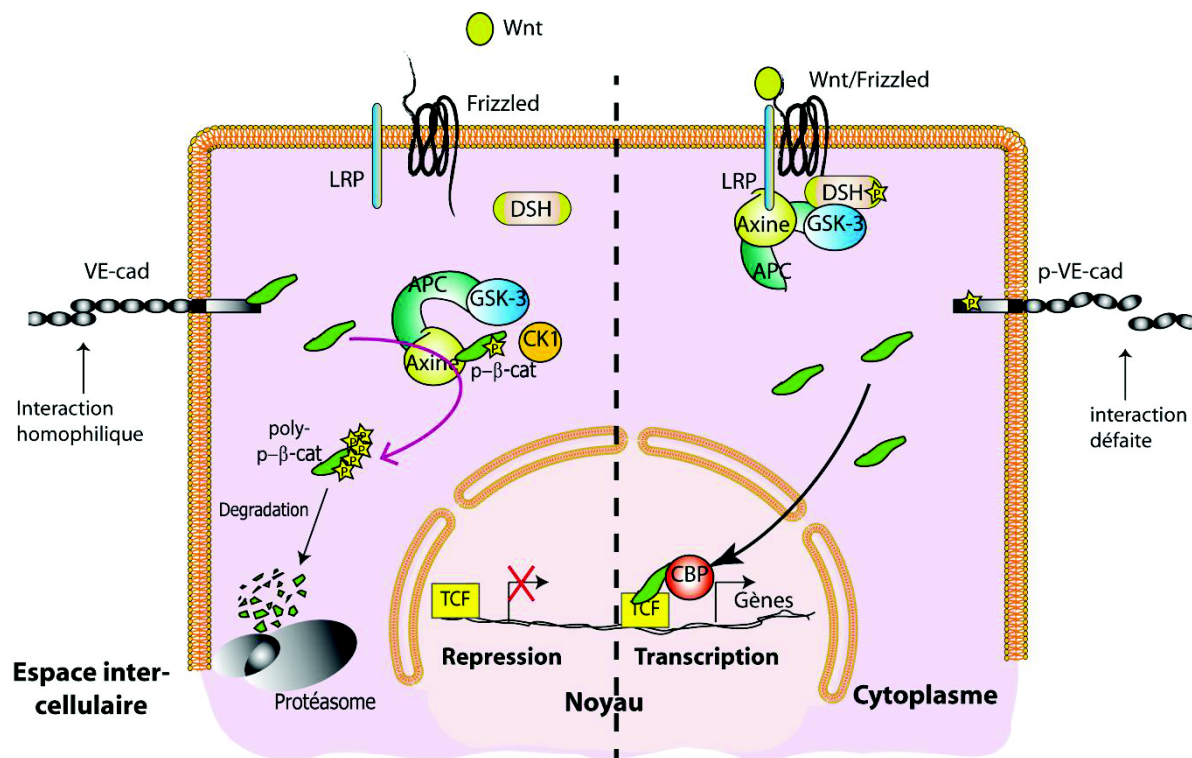


Figure III.4: Régulation de l'activité de la β -caténine par la VE-cadhérine et la voie de signalisation Wnt. L'interaction de la β -caténine avec la VE-cadhérine l'empêche d'être libre dans le cytoplasme pour être transloquée dans le noyau. En absence de l'activation de la voie Wnt, la β -caténine libre est recrutée par le complexe axine/APC pour être phosphorylée sur plusieurs sites et transloquée dans le protéasome pour y être dégradée. En présence d'activation de la voie Wnt, la β -caténine libérée des jonctions adhérentes est transloquée dans le noyau pour participer à la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire.

ténuer l'effet de l'absence de la β -caténine. Ce changement de partenaire de la VE-cadhérine pourrait avoir un effet sur la liaison du complexe de VE-cadhérine avec les filaments d'actines et faire plus de liaison avec les filaments intermédiaires de vimentines. La phosphorylation du complexe de VE-cadhérine a été montrée comme étant défavorable à la stabilité des jonctions adhérentes (Wallez and Huber 2008).

1b. β -caténine dans la prolifération endothéliale

En plus de s'associer à la cadhérine, la β -caténine peut aussi se déplacer dans le noyau pour moduler l'expression des gènes impliqués dans le contrôle de la croissance et le modelage tissulaire (Moon, Bowerman et al. 2002). En effet, dans le noyau, elle peut se lier aux régulateurs de transcription (voir Figure III.4). Cette capacité de la β -caténine de se retrouver dans le cytoplasme et être transporté dans le noyau est finement régulée par un complexe de protéines Axine/APC (pour adenomatous polyposis

coli) qui régule la stabilité de la β -caténine. Ce complexe provoque la phosphorylation de la β -caténine par CK1 (casein kinase 1) et puis par GSK (glycogen synthase kinase) entraînant sa dégradation par le protéasome (Aberle, Bauer et al. 1997). Dans les conditions normales, les molécules de β -caténines non-liées à la cadhérine sont rapidement dégradées, plusieurs voies de signalisation régulent cette dégradation pour influencer la signalisation conduite par la β -caténine. Parmi ces voies, il y a la voie de signalisation canonique des facteurs de croissance Wnt (Wingless and integration 1). Les facteurs Wnt, quand ils sont en quantité suffisante, se fixent sur leurs récepteurs de la famille Frizzled, induisent l'activation de DSH (Dishevelled), le recrutement du complexe Axine/APC et puis l'inactivation de GSK-3 (voir Figure III.4). Le recrutement de ce complexe à la membrane entraîne son association avec LRP (LDL receptor-related protein) et la dégradation de l'axine. Cela empêche la dégradation de la β -caténine et surtout permet sa translocation dans le noyau pour participer à la transcription de certains gènes (Heuberger and Birchmeier 2010). L'implication de la voie de signalisation Wnt- β -caténine sur la régulation de la prolifération des cellules endothéliales et dans les événements associés au remodelage vasculaire est peu claire.

Néanmoins, plusieurs observations amènent à penser que la voie Wnt-Frizzled- β -caténine est impliquée dans l'organisation, la fonction et la prolifération des cellules endothéliales. La transfection des cellules endothéliales avec *Wnt-1* induit une augmentation de la prolifération (Wright, Aikawa et al. 1999). Il a été rapporté que Frizzled-5 serait crucial pour l'angiogénèse placentaire et du sac vitellin (Ishikawa, Tamai et al. 2001). L'accumulation dans le cytoplasme de la β -caténine a aussi été observée dans les cellules endothéliales pendant l'angiogénèse après infarctus du myocarde (Blankesteyn, van Gijn et al. 2000). La troncation des sites de phosphorylation de la β -caténine par GSK conduit à la croissance et à la morphogénèse endothéliale (Venkiteswaran, Xiao et al. 2002). En dépit de toutes ces évidences, le rôle effectif de cette voie de signalisation dans les cellules endothéliales reste mal compris. Cependant, il est connu que le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine de même que la β -caténine ont un rôle critique dans la régulation de la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF (Cattelino, Liebner et al. 2003, Grazia Lampugnani, Zanetti et al. 2003). Il doit être un axe de signalisation, centré autour de la VE-cadhérine et la β -caténine, qui régule la prolifération et l'organisation des cellules endothéliales pendant l'angiogénèse (Bussolino, Serini et al. 2001).

III.2.2.3.2. *Caténine p120*

Un deuxième sous-type de protéines armadillo est la caténine p120 qui ne partage pas la structure de la β -caténine. La caténine p120 a d'abord été identifiée comme substrat de la tyrosine kinase Src et puis a été rapportée pour sa capacité d'interagir avec le domaine juxtamembranaire des cadhérines classiques dont la VE-cadhérine (Anastasiadis and Reynolds 2000). Cette interaction est cruciale pour la fonction de la VE-cadhérine dans les jonctions. Plusieurs rôles de la caténine p120 ont été rapportés.

2a. Caténine p120 dans la stabilité de la VE-cadhérine

Contrairement à la β -caténine et la plakoglobine, la caténine p120 ne relie pas les cadhérines au cytosquelette d'actines, mais semble plutôt jouer un rôle crucial dans la stabilité de la cadhérine aux jonctions en empêchant l'endocytose et la dégradation subséquente de la molécule de VE-cadhérine (Xiao, Garner et al. 2005). Elle semble avoir une implication dans la régulation de l'assemblage des cadhérines et de l'organisation local du cytosquelette d'actine pendant cet assemblage (Thoreson, Anastasiadis et al. 2000). En outre, p120 module la forme de la cellule en régulant l'activité des protéines de type Rho-GTPase comme RhoA, Rac1 et Cdc42 (Anastasiadis 2007). Ces trois protéines sont importantes dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine. L'association de la VE-cadhérine avec la caténine p120 régulerait ainsi cette fonction associée à p120. Il a été montré par Iyer et al que la surexpression du domaine juxtamembranaire (domaine de fixation de p120 à la VE-cadhérine) conduit à la rupture des jonctions due à la dissociation de la caténine p120 (Iyer, Ferreri et al. 2004). De même une trop forte expression de la caténine p120 entraîne aussi un affaiblissement de la barrière endothéliale à cause d'une trop forte inhibition de l'activité basale de RhoA, nécessaire pour la contractilité des filaments d'actines et donc pour la stabilité des jonctions (Iyer, Ferreri et al. 2004).

2b. Expression de p120 et division cellulaire

Par ailleurs, p120 serait impliquée dans la régulation de l'expression génique et le contrôle du cycle cellulaire. La caténine p120 possède des séquences d'adressage nucléaire NLS (Nuclear Location Signal) et peut être donc transportée dans le noyau. Dans le noyau, p120 s'associe au répresseur transcriptionnel Kaiso (Daniel and Reynolds 1999). Ce régulateur de transcription a été décrit comme pouvant réguler négativement les gènes cibles induits par le couple de facteur β -caténine/TCF suite à l'activation de la voie de signalisation Wnt. Or, le site de liaison de Kaiso à l'ADN se superpose au domaine de liaison de p120. Ainsi, la caténine p120 s'associe avec Kaiso et lève la répression transcriptionnelle en empêchant ce dernier de se fixer sur ses gènes cibles. De cette manière, la caténine p120 cytoplasmique régule l'expression génique des gènes cibles de la voie Wnt (Daniel 2007). En plus, la caténine p120 a été rapportée comme pouvant participer à la division cellulaire dans le cancer. En effet, pendant la progression du cancer colorectal, cette caténine est capable de se lier à la cycline E pour former un complexe stable. Ce complexe induirait la prolongation de la phase S ainsi que la synthèse de centrosomes surnuméraires provoquant la polyploïdie (Chartier, Oddou et al. 2007). Ces données indiquent que la caténine p120 aurait un rôle important dans la modulation de l'expression des gènes de la voie Wnt/ β -caténine impliqués dans la morphogénèse ou encore la croissance endothéliale. Elle serait très importante aussi dans la division cellulaire. L'existence de cette régulation du cycle cellulaire dans les cellules endothéliales normales reste inconnue.

III.2.2.4 Kinases et phosphatases des jonctions adhérentes

III.2.2.4.1. *Définition*

Les phosphorylation-déphosphorylation de protéines sont des modifications post-traductionnelles capitales des protéines, qui interviennent dans un très grand nombre de processus cellulaires (différenciation, division, prolifération, apoptose...) et en particulier dans les mécanismes de signalisation. (voir Figure 0.5). Les réactions de phosphorylation sont catalysées par des protéines kinases qui transfèrent un groupement phosphate à partir de l'adénosine triphosphate (ATP) sur le groupement hydroxyle (-OH) des chaînes latérales des acides aminés ayant une fonction alcool (sérine, thréonine et tyrosine). La phosphorylation induit des modifications fonctionnelles très importantes de la protéine cible comme l'amplification ou l'inhibition de l'activité enzymatique, les changements de localisation cellulaire, le changement de structure, et ces modifications permettent l'association avec d'autres protéines. La phosphorylation est une modification réversible et la déphosphorylation des phosphoprotéines est réalisée dans la cellule par des phosphoprotéine phosphatases (Hubbard and Till 2000).

1a. *Phosphorylations sur résidus sérine/thréonine*

Les sérine-thréonine kinases comportent les protéines kinases régulées par les nucléotides cycliques comme l'AMPc: protéine kinase A (PKA), la protéine kinase activée par le diacylglycerol: protéine kinase C (PKC) ou encore les MAP kinases (Mitogen-activated protein kinases): ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), c-jun N-terminal kinase ou encore MAP kinase p38.

1b. *Phosphorylations sur résidus tyrosine*

La phosphorylation sur les résidus tyrosine est peu fréquente dans la cellule comparée à celle sur les résidus sérine/thréonine. Pourtant la phosphorylation des résidus tyrosine a une incidence biologique importante. Par exemple, l'activité d'un grand nombre de facteur de croissance est contrôlée par la phosphorylation de cet acide aminé. Plus de 90 protéines tyrosine kinases sont recensées dans le génome humain. Deux groupes se distinguent ; les tyrosine kinases cytoplasmiques et les protéines tyrosine kinases récepteurs transmembranaires ou RTK (receptor tyrosine kinase). Les RTKs sont constitués d'un domaine extracellulaire qui fixe un ligand spécifique, un domaine transmembranaire, et un domaine catalytique intracellulaire qui fixe et phosphoryle les protéines cibles. La fixation du ligand au domaine extracellulaire entraîne des modifications structurales des protéines tyrosine kinases qui les activent.

III.2.2.4.2. *Tyrosine kinases des jonctions :*

De nombreuses kinases pour tyrosine ont été identifiées comme étant associées au complexe de VE-cadhérine et ayant une activité régulatrice des jonctions adhérentes (voir Figure III.6) (Dejana, Orsenigo et al. 2008).

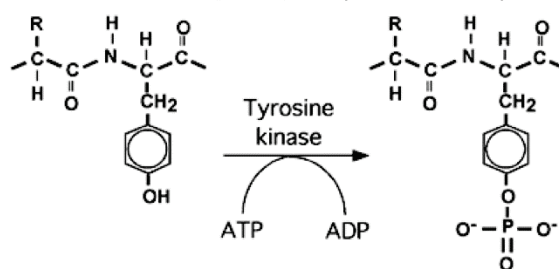
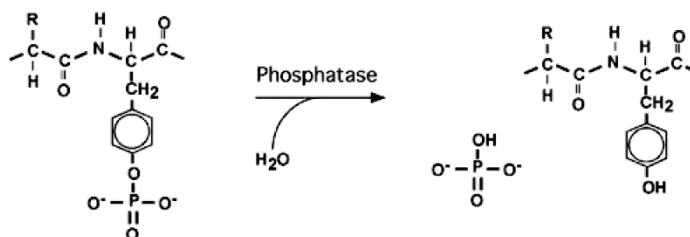
A. Réaction d'une phosphorylation sur tyrosine**B. Réaction d'une déphosphorylation par une phosphatase pour tyrosine**

Figure III.5: Les réactions de phosphorylation et de déphosphorylation effectuées par les kinases et les phosphatases respectivement. A. phosphorylation une tyrosine et B. hydrolyse du groupement phosphate

2a. VEGFR-2/KDR/Flk-1 :

Le KDR/Flk-1, un récepteur à activité kinase pour tyrosine, a été retrouvé associé à la VE-cadhérine in vivo comme in vitro (Grazia Lampugnani, Zanetti et al. 2003, Lambeng, Wallez et al. 2005). Cette association semble nécessiter la présence de la β -caténine. Cependant la question qui est débattue est de savoir si cette association est constitutive ou si elle intervient à la suite d'une activation du récepteur KDR. Néanmoins cette association a été proposée comme un moyen pour approcher le récepteur activé aux protéines des jonctions adhérentes afin de les phosphoryler, expliquant certaines étapes de l'effet du VEGF sur la stabilité de ces jonctions (Weis and Cheresch 2005). Cette association peut avoir comme effet de réduire l'activité de KDR et ainsi initier l'inhibition de la prolifération connue sous le nom d'inhibition de contact (Grazia Lampugnani, Zanetti et al. 2003).

2b. Les tyrosine-kinases de la famille Src (SFks)

Elles sont impliquées dans la signalisation du VEGFR-2 et ont été impliquées dans la régulation de la perméabilité vasculaire, l'angiogénèse (Eliceiri, Paul et al. 1999), la motilité cellulaire et l'apoptose (Abu-Ghazaleh, Kabir et al. 2001). D'autre part, l'expression et l'activité de Src sont associées à des désordres prolifératifs et de nombreux cancers (Frame 2002).

Structure : L'activité kinase des protéines de la famille Src est régulée par l'intervention de deux domaines d'interaction protéique : les domaines SH2 et SH3 (pour Src homology 2 et 3 respectivement).

Les domaines SH2 sont des séquences conservées d'une centaine d'acides aminés, qui reconnaissent et lient spécifiquement certains résidus tyrosine phosphorylés. Les domaines SH3 sont des séquences capables d'interagir avec des séquences riches en proline. A l'état inactif, la kinase Src est verrouillée dans une conformation repliée sur elle-même, qui implique son domaine SH3 et SH2. Ce dernier interagit avec une tyrosine inhibitrice en position carboxy-terminal. L'activation de la kinase a lieu suite à la déphosphorylation de cette tyrosine qui permet l'ouverture de l'enzyme (Figure III.6).

SFK endothéliales et jonctions adhérentes : Il y a essentiellement neuf membres de la famille Src incluant c-Src, Fyn, Yes, Yrk, Lyn, Lck, Hck, Fgr et Blk. Les kinases c-Src, Fyn, Yes et Yrk sont co-exprimées dans plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales alors que les autres le sont plus particulièrement dans les cellules hématopoïétiques. Au niveau des jonctions adhérentes, la kinase c-Src a été retrouvée associée au complexe de VE-cadhérine de façon constitutive (Lambeng, Wallez

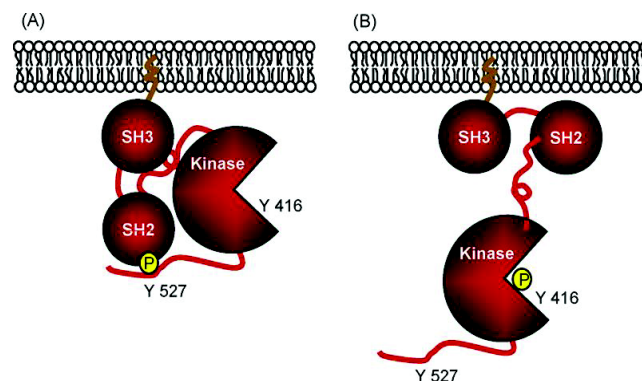


Figure III.6: Régulation de l'activité catalytique de Src. D'après (Hu, Place et al. 2008). (A) conformation inactive. (B) conformation active.

et al. 2005). Cette association donne à c-Src, qui se lie par ailleurs à KDR, la possibilité de phosphoryler les protéines des jonctions adhérentes dont la VE-cadhérine, la caténine p120 ou la β -caténine (Anastasiadis and Reynolds 2000, Wallez, Cand et al. 2007). Cette activité de Src semble être importante pour l'induction de la perméabilité endothéliale par certains médiateurs comme le VEGF. Mais le mécanisme moléculaire à la base de cette interaction reste inconnu.

2c. Csk (C-terminal Src kinase)

La kinase Csk est un régulateur négatif des SFKs, qui inactive ces enzymes en phosphorylant leur tyrosine inhibitrice et en imposant la conformation verrouillée. Chez la souris, l'invalidation génique de Csk engendre une létalité embryonnaire (Imamoto and Soriano 1993). L'analyse d'embryons chimériques contenant des cellules WT et Csk^{-/-} a mis en évidence des défauts dans le bourgeonnement angiogénique et le remodelage vasculaire (Duan, Imamoto et al. 2004). De plus, l'inhibition de l'expression de Csk dans des cellules endothéliales humaines par interférence ARN augmente la proli-

fération cellulaire (Kaplan, Bibbins et al. 1994, Heibeck, Ding et al. 2009). La kinase Csk a été montrée comme partenaire de la VE-cadhérine préalablement phosphorylée par Src (Baumeister, Funke et al. 2005). Cette association se fait par la reconnaissance de la tyrosine Y685 phosphorylée de la VE-cadhérine par le domaine SH2 de Csk, ainsi permet l'activation de CSK et l'inhibition subséquente de l'activité de la kinase Src.

2d. *PYK-2 (proline-rich tyrosine kinase 2)*

La kinase PYK-2 phosphoryle directement la β -caténine pendant la transmigration des leucocytes et cette activité serait nécessaire pour ce processus (Allingham, van Buul et al. 2007). Mais il n'y a pas d'éléments permettant de savoir si cette kinase s'associe avec le complexe de VE-cadhérine aux jonctions adhérentes.

2e. *SYK (Spleen Tyrosine Kinase)*

La kinase Syk est un homologue de la protéine ZAP-70 (Zeta-Activated Protein 70kDa) et appartient à une famille autonome de tyrosine kinases cytoplasmiques, possédant deux domaines SH2 adjacents. Elle a tout d'abord été isolée à partir de la rate, les poumons et le thymus, puis elle a été clonée dans la rate de porc en 1991 (Taniguchi, Kobayashi et al. 1991). L'invalidation génique chez la souris a montré un phénotype endothélial avec une létalité due à des hémorragies et des malformations des vaisseaux. (Inatome, Yanagi et al. 2001). In vitro, l'utilisation d'un dominant négatif de SYK a permis de montrer qu'il est nécessaire à la migration et la prolifération endothéliales. Le rôle et la signalisation induite par Syk sont, par contre, beaucoup moins connus que celle des SFKs dans les cellules endothéliales. Il a été montré au laboratoire que la kinase Syk participe à la phosphorylation de la VE-cadhérine sur la tyrosine Y658. Mais il n'y a pas d'éléments indiquant la localisation de Syk dans les jonctions adhérentes.

III.2.2.4.3. *Tyrosine phosphatases des jonctions adhérentes*

Plusieurs tyrosine phosphatases ont été identifiées comme étant associées au complexe de VE-cadhérine et ayant une activité régulatrice des jonctions adhérentes (Dejana, Orsenigo et al. 2008).

3a. *La phosphatase PTP μ*

La phosphatase PTP μ (pour zonula adherens-associated protein tyrosine phosphatase mu) est une phosphatase pour tyrosine spécifiquement exprimée dans les cellules endothéliales. Cette phosphatase s'associe à la VE-cadhérine et régule son niveau de phosphorylation ainsi que l'intégrité de la jonction adhérente des petits vaisseaux du poumon (Sui, Kiser et al. 2005).

3b. *La VE-PTP :*

Une autre phosphatase pour tyrosine, spécifique des cellules endothéliales est la VE-PTP (pour vascular endothelial-specific protein tyrosine phosphatase), localisée exclusivement aux jonctions adhérentes endothéliales. Cette phosphatase s'associe avec la VE-cadhérine via leur domaine

extracellulaire le plus proximal par rapport à la membrane plasmique et ainsi régule constitutivement la phosphorylation du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine (Nawroth, Poell et al. 2002). Cette association est rompue pendant l'émigration de leucocytes ou la perméabilité endothéliale induite par le VEGF (Nottebaum, Cagna et al. 2008).

3c. *La phosphatase SHP-2/PTP2C*

C'est une phosphatase pour tyrosine qui a aussi été rapportée comme étant associée constitutivement au complexe de VE-cadhérine, via la β -caténine précisément. Sous l'action d'inducteurs de perméabilité comme la thrombine, elle se dissocie du complexe pour permettre la phosphorylation de la β -caténine, la plakoglobine et la caténine p120 et permet ainsi la rupture de la jonction (Ukropec, Hollinger et al. 2000). SHP2 vient d'être proposée comme étant essentielle à la restauration des jonctions adhérentes après traitement à la thrombine. Elle agirait directement sur la phosphorylation de la β -caténine (Timmerman, Hoogenboezem et al. 2012).

3d. *La phosphatase DEP-1*

La DEP-1 (density enhanced tyrosine phosphatase 1) a été rapportée comme étant nécessaire pour l'effet inhibiteur de la VE-cadhérine sur la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF (Grazia Lampugnani, Zanetti et al. 2003, Lampugnani, Orsenigo et al. 2006). Cette phosphatase devrait s'associer à une ou plusieurs protéines du complexe de VE-cadhérine et ainsi inhiber l'activité de VEGFR-2 en contact avec la VE-cadhérine. Mais aucune évidence de l'interaction de DEP-1 avec le complexe de VE-cadhérine n'est disponible à ce jour. Cependant la phosphorylation sur tyrosine de DEP-1 vient d'être rapportée comme étant impliquée dans l'activation de Src en la dephosphorylant sur Y529 et ainsi elle participerait à la survie des cellules endothéliales (Spring, Chabot et al. 2012).

Ces kinases et phosphatases pour tyrosine, qui ont été les plus étudiées dans la régulation de la fonction des jonctions adhérentes, sont cruciales pour la flexibilité de la barrière endothéliale et l'homéostasie des vaisseaux sanguins.

III.2.2.4.4. *Sérine/thréonine kinases/phosphatases et perméabilité endothéliale*

4a. *La protéine kinase PAK (p21-activated kinase)*

La kinase PAK a été rapportée par Gavard et al comme pouvant phosphoryler la VE-cadhérine sur la sérine S665 permettant son internalisation (Gavard and Gutkind 2006). Mais le mécanisme de cette interaction reste à démontrer.

4b. *La protéine kinase Akt*

L'activité de la kinase Akt dans la voie de la PI3K est augmentée par le complexe VE-cadhérine/VEGFR-2 et certaines sérine/thréonine kinases de la voie des MAPK modulent la phospho-

rylation sur tyrosine de la VE-cadhérine (Wallez and Huber 2008). D'autres études sont nécessaires pour mieux connaître le lien entre ce groupe de kinases et la VE-cadhérine.

Aucune sérine/thréonine phosphatase n'a été décrite à ce jour comme étant associée aux jonctions adhérentes.

III.3 Rôle de la VE-cadhérine dans la fonction et l'intégrité de l'endothélium

L'intégrité de l'endothélium est une composante majeure pour éviter ces effets associés à la dysfonction endothéliale et le rôle de la VE-cadhérine est capital pour le maintien de cette intégrité.

Le rôle majeur de la protéine a été abordé par obtention de souris dont le gène de la VE-cadhérine a été invalidé ou tronqué pour donner une VE-cadhérine démunie de 80 AA dans son domaine cytoplasmique. (Carmeliet, Lampugnani et al. 1999). Ceci a permis de montrer à la fois l'importance de cette molécule dans les premières phases de la vie embryonnaire mais aussi son implication dans la signalisation intracellulaire. Son implication dans de nombreux processus cellulaires primordiaux pour la physiologie de la cellule endothéliale a été décrite et certains mêmes de ces processus peuvent nécessiter des modifications post-traductionnelles de la VE-cadhérine. Dans cette section nous allons voir l'état des connaissances sur ces aspects de la fonction de la VE-cadhérine.

III.3.1 VE-cadhérine dans l'angiogenèse

C'est l'invalidation du gène de la VE-cadhérine chez la souris qui a permis de monter son importance majeure dans l'angiogénèse (Carmeliet, Lampugnani et al. 1999, Gory-Faure, Prandini et al. 1999). Ces embryons ne présentent pas de problème de vasculogénèse, en effet, les cellules mésodermiques se différencient correctement en cellules endothéliales, par contre les plexus vasculaires primaires bien formés ne se développent pas d'avantage pour compléter le réseau vasculaire, le remodelage vasculaire est perturbé et l'angiogénèse est incomplète (voir Figure III.7). Les annexes embryonnaires comme le sac vitellin présentent les plus graves malformations vasculaires et les embryons meurent à un stade de développement précoce (E11,5). Des expériences *in vitro* sur des cellules souches embryonnaires déficientes en VE-cadhérine ont permis de montrer l'absence de bourgeonnement embryonnaire confortant l'implication de la VE-cadhérine dans l'angiogénèse embryonnaire (Vittet, Buchou et al. 1997). L'étude du rôle de la VE-cadhérine dans les différentes étapes de l'angiogénèse embryonnaire chez le poisson zèbre a permis de confirmer l'importance capitale de la VE-cadhérine dans la formation d'un réseau vasculaire stable et fonctionnel (Montero-Balaguer, Swirsding et al. 2009). Ces études démontrent le rôle de la VE-cadhérine dans la mise en place des connections vascu-

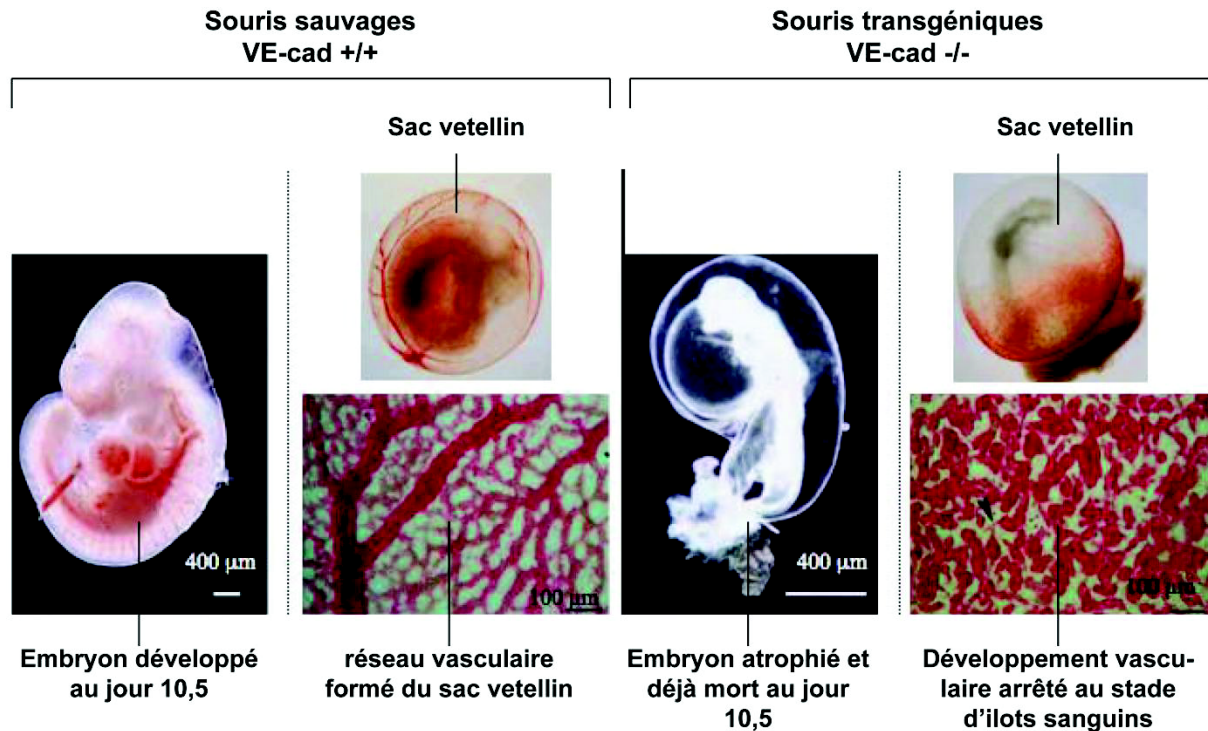


Figure III.7: Implication de la VE-cadhérine dans la formation du réseau vasculaire : comparaison des embryons et des sacs vitellins sauvages et déficients en VE-cadhérine (adaptée de (Gory-Faure, Prandini et al. 1999)). Les embryons déficients en VE-cadhérine au jour 10,5 présentent de graves malformations du réseau vasculaire. Les vaisseaux sanguins du sac vitellin sont extrêmement désorganisés comme le montre le marquage PECAM.

laire permettant l'établissement d'un réseau vasculaire normal et stable sans bourgeonnement anarchique.

Plus récemment, une étude concernant le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine dans l'angiogénèse a été rapportée par Li et al qui le domaine EC1-3 injecté dans un modèle murin de tumeur, était capable d'inhiber l'angiogénèse tumorale et par là même la croissance tumorale (Li, Shi et al. 2010). Le mécanisme proposé est l'empêchement de la formation des jonctions établies pendant l'angiogénèse et ainsi la stabilisation des vaisseaux tumoraux néoformés. Ces résultats très novateurs ne préjugent pas pour autant de l'effet du domaine extracellulaire complet de la VE-cadhérine EC1-5 sur l'angiogénèse.

Au total, l'implication de la VE-cadhérine dans l'angiogénèse est clairement démontrée in vivo

III.3.2 Inhibition de la prolifération cellulaire

La découverte des effets de la VE-cadhérine sur la prolifération cellulaire a été faite par l'équipe de E Déjana en 1996 qui a testé la culture de cellules endothéliales (HUVECs) sur des boîtes de culture préalablement « coatées » avec le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine et a pu montrer l'inhibition

de la prolifération de cellules endothéliales (Caveda, Martin-Padura et al. 1996). De façon similaire, des cellules CHO qui n'expriment pas la VE-cadhérine et qui ont perdu leur inhibition de contact, lorsqu'elles sont transfectées avec la VE-cadhérine, voient leur prolifération cellulaire inhibée. De façon inverse, la même équipe a montré que des cellules endothéliales déficientes en VE-cadhérine perdent leur capacité d'inhibition de contact et continuent à proliférer jusqu'à atteindre des densités cellulaires très élevées (Grazia Lampugnani, Zanetti et al. 2003). Des données similaires avaient été obtenues avec PECAM et la E-cadherine dans le même temps suggérant que les molécules d'adhérence pouvaient par un mécanisme non encore connu à l'époque, agir sur le cycle cellulaire. Depuis, plusieurs mécanismes moléculaires de signalisation, pouvant expliquer ce phénomène contrôlé par la VE-cadhérine, ont été proposés (voir Figure III.8) :

1. La séquestration de la β -caténine par la VE-cadhérine pourrait empêcher la transcription et l'expression subséquente de gènes de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire. En effet une étude intéressante menée par Pierce et al, a montré qu'une surexpression du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine dans des cellules tumorales était suffisante pour bloquer l'activité transcriptionnelle de la β -caténine et conduire à la mort cellulaire (Pierce, Wang et al. 2003). Comme évoqué dans les sections précédentes, l'association de la β -caténine à la VE-cadhérine permet sa séquestration et ainsi empêche la translocation de la β -caténine dans le noyau et conduit à l'inhibition de la prolifération.

2. Un autre processus concerne l'interaction VE-cadhérine-VEGFR-2. En effet, une autre étude de l'équipe de Dejana a montré que la VE-cadhérine pouvait interagir avec le récepteur de VEGF KDR et entraîner une forte diminution de son auto-phosphorylation, conduisant à une réduction de l'activité des MAP kinases et par la même une diminution de la prolifération cellulaire (Lampugnani, Orsenigo et al. 2006). Comme évoqué précédemment dans une autre section de ce chapitre (voir page 81), le complexe de VE-cadhérine est aussi associé à DEP-1 qui serait responsable de la diminution de phosphorylation du récepteur en assurant sa déphosphorylation. Cette situation est retrouvée dans les cellules endothéliales confluentes alors que dans les cellules éparses aux jonctions peu jointives KDR est internalisé plus rapidement et la prolifération cellulaire n'est pas inhibée-

3. Un troisième processus concerne l'interaction VE-cadhérine-Shc démontré par la même équipe italienne qui a postulé que la VE-cadhérine pourrait inhiber la prolifération des cellules endothéliales en séquestrant Shc inactivée par déphosphorylation. Cette protéine de la transduction du signal, n'a pas d'activité enzymatique propre, mais possède un domaine d'interaction protéine-protéine de type SH2 et SH3. Shc se lie à VEGFR-2 qui la phosphoryle, puis Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), se lie à la tyrosine phosphorylée de Shc par son domaine SH2. Sos (son of sevenless), un facteur d'échange de guanosine (GEF pour Guanosine exchange factor) permettant l'échange GDP/GTP, interagit avec Grb2 dans une région riche en proline par son domaine SH3. Sos transforme Ras-GDP en Ras GTP (forme active), qui peut recruter Raf (MAPKKK) qui va activer les MAPK (Pelicci, Lanfranccone et al. 1992). La VE-cadhérine peut interagir par l'intermédiaire des 82

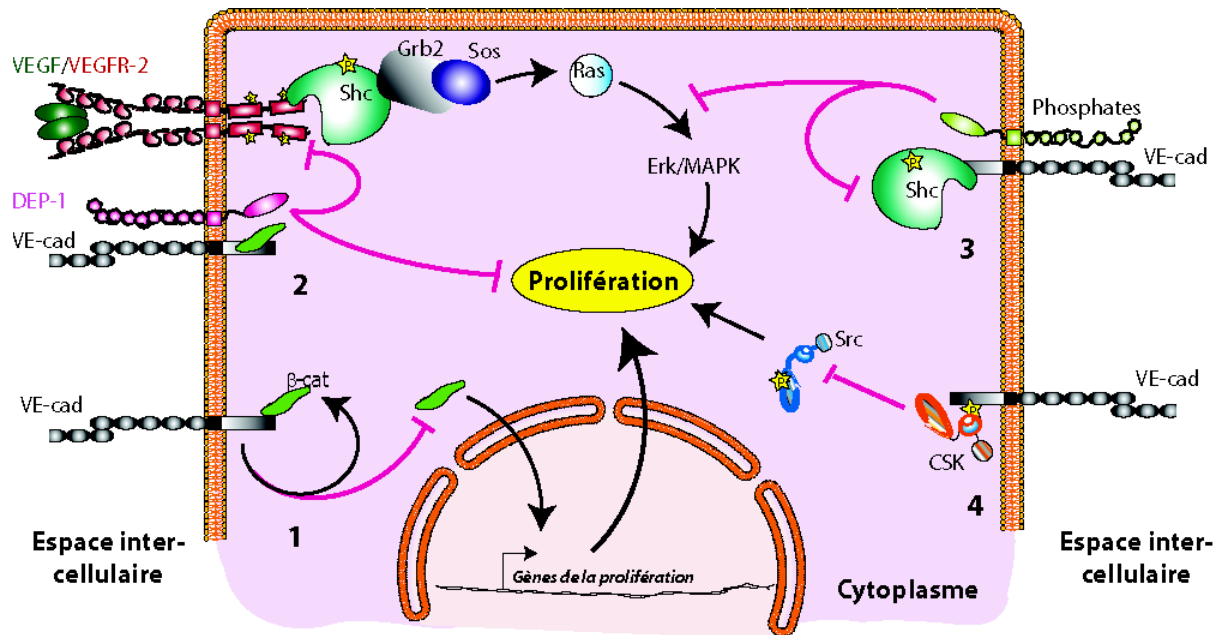


Figure III.8: Les différents mécanismes d'inhibition de la prolifération cellulaire induite par la présence de la VE-cadhérine aux jonctions adhérentes : 1) séquestration de la β-caténine par la VE-cadhérine, 2) inhibition de l'activité de VEGFR2 par Dep-1 présente dans la jonction adhérente ; 3) séquestration de Shc activée qui est ensuite déphosphorylée; 4) association de CSK avec le site Y685 de la VE-cadherine qui ensuite inhibe Src.

derniers acides aminés du côté C-terminal avec Shc (Zanetti, Lampugnani et al. 2002), et cette association conduit à la déphosphorylation de Shc, sous l'action de phosphatases associées au complexe de VE-cadhérine. De cette façon, la VE-cadhérine inhiberait la voie des MAPK et donc la prolifération cellulaire.

4. Un quatrième processus concerne l'association VE-cadhérine-Csk, tyrosine kinase inhibitrice de l'activité Src (Harrison 2003), Csk interagit par son domaine SH2 avec le site Y685 de la VE-cadhérine quand il est phosphorylé après action de VEGF conduisant ainsi à l'inhibition de Src et de la prolifération endothéliale (Baumeister, Funke et al. 2005).

Au total tous ces processus semblent fortement impliquer la VE-cadhérine dans la régulation de la prolifération cellulaire endothéliale bien que la protéine n'ait pas d'activité enzymatique propre ni de capacités de liaison à des facteurs de croissance. Il est raisonnable de penser qu'une combinaison de ces différents processus soit responsable de l'effet final observé. Une démonstration *in vivo* de ces mécanismes seraient nécessaire pour étayer ces résultats.

III.3.3 VE-cadhérine et survie cellulaire induite par le VEGF

- La survie cellulaire induite par le VEGF passe par l'activation de voies de signalisation intracellulaire anti-apoptotiques et l'inhibition de voies pro-apoptotiques. L'équipe de P Carmeliet a pu montrer que l'absence de VE-cadhérine ou une troncature de 80 AA dans son domaine cytoplasmique conduisent à l'apoptose endothéliale en supprimant la transmission du signal de survie endothéliale induit par le VEGF via la kinase Akt et Bcl2, par diminution de l'association VEGFR-2, la β -caténine et PI3-kinase suggérant fortement l'implication de la VE-cadhérine dans la survie endothéliale (Carmeliet, Lampugnani et al. 1999). Par analyse génomique, l'équipe de E Dejana a pu montrer que l'expression du gène Gas-1 (growth factor arrest-specific 1) est augmenté par l'expression de la VE-cadhérine. Ce gène spécifique de l'arrêt de la croissance cellulaire, code pour une protéine avec une ancre GPI (Stebel et al, 2000) qui n'est pas exprimée dans les cellules en croissance ou transformées. Exprimé dans les cellules endothéliales, Gas-1 est un protecteur des cellules contre l'apoptose. Donc la VE-cadhérine peut intervenir dans la survie des cellules endothéliales en incrémentant l'activation de la voie PI3K et l'expression Gas-1.

III.3.4 VE-cadhérine et force hémodynamique

Les cellules endothéliales sont exposées et répondent aux contraintes de cisaillement résultant du flux sanguin en mouvement dont la force hémodynamique est variable le long de l'arbre vasculaire. Celui-ci va induire différentes réponses des cellules endothéliales dont l'activation ou la répression de certains gènes impliqués dans leur morphologie. Au plan moléculaire, il a été montré une contribution majeure de la plakoglobine dans la stabilisation des jonctions adhérentes face aux contraintes de cisaillement en association avec la VE-cadhérine (Schnittler, Püschel et al. 1997). Une autre étude a montré que la contrainte de cisaillement induit une rapide association de VEGFR-2 aux molécules des jonctions adhérentes, VE-cadhérine et β -caténine, et au cytosquelette. Dans les cellules endothéliales déficientes en VE-cadhérine, ce processus n'a pas lieu suggérant que VEGFR-2 et jonctions adhérentes agissent comme co-transducteurs des signaux de stress en réponse aux contraintes de cisaillement dans les cellules endothéliales vasculaires. (Shay-Salit, Shushy et al. 2002, Tzima, Irani-Tehrani et al. 2005). Les éventuelles modifications de ce complexe, pouvant expliquer sa fonction de mécanosenseur, restent inconnues.

III.3.5 Contrôle des jonctions serrées

Bien que formées de molécules différentes, jonctions serrées et jonctions adhérentes sont fonctionnellement et structurellement liées, mais les voies de signalisation impliquées dans ce lien étaient inconnues. Taddei et al ont montré que la VE-cadhérine régule le gène codant pour la protéine adhésive

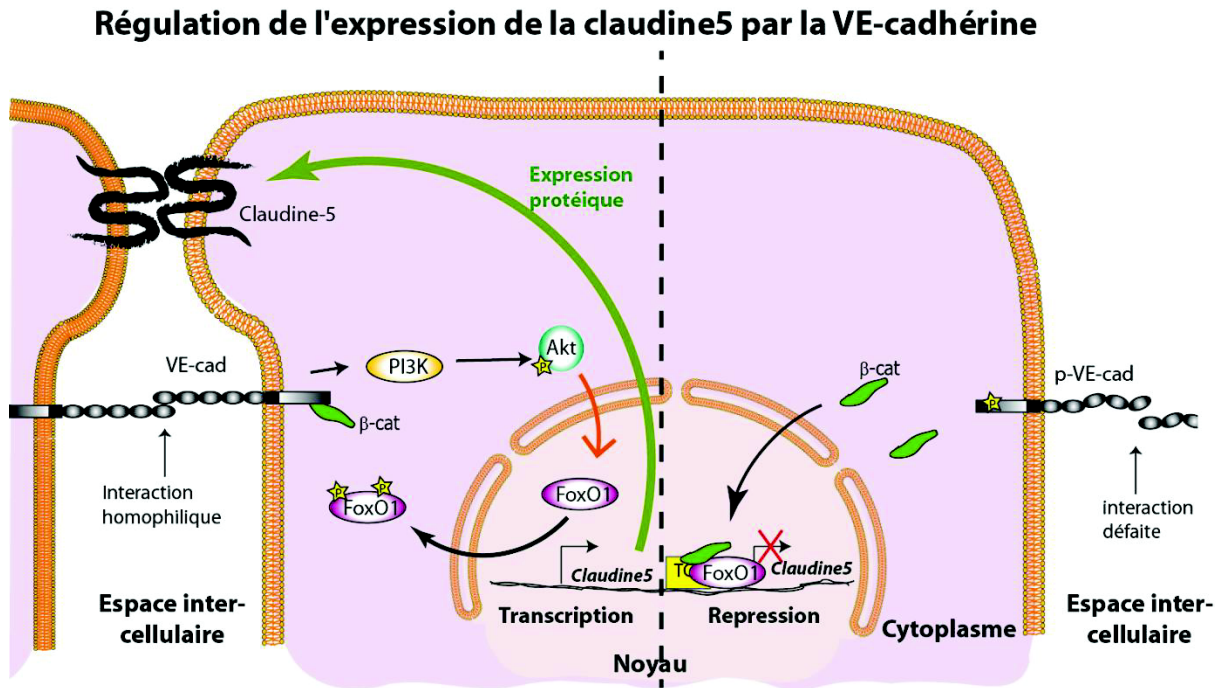


Figure III.9: La VE-cadhérine régule l'expression de la claudine-5 et l'intégrité de l'endothélium

claudine-5 des jonctions serrées. Au plan moléculaire, l'expression et l'assemblage de la VE-cadhérine aux jonctions sont des prérequis pour cet effet. Pour déterminer la voie impliquée dans ce processus, les auteurs ont fait un screening génomique et montré que le gène de la claudine-5 était l'un des gènes réprimés, par une forme constitutivement active du facteur de transcription FOXO1 (forkhead box factor 1). Or FOXO1 est phosphorylé et inactivé par la voie PI3K-Akt, une voie aussi activée par l'assemblage de la VE-cadhérine. Les auteurs ont donc examiné si la VE-cadhérine pouvait réguler la surexpression de la claudine-5 en inactivant FOXO1 et ils montrent que l'expression et l'assemblage de la VE-cadhérine activent la voie Akt, qui à son tour induit la phosphorylation de FOXO1 et inhibent son activité transcriptionnelle conduisant à une surexpression de la claudine-5. Les auteurs montrent également qu'en l'absence d'expression de la VE-cadhérine et, par voie de conséquence, absence de claudine-5 dans des cellules en culture, il n'y a pas de modification de l'expression ou de l'organisation des autres protéines jonctionnelles, mais par contre, la perméabilité paracellulaire a été significativement augmentée (Taddei, Giampietro et al. 2008) (voir Figure III.9). La VE-cadhérine est la protéine de l'intégrité de l'endothélium vasculaire.

III.3.6 Modulation de la force des jonctions intercellulaires par la VE-cadhérine

Les cellules endothéliales ont plusieurs mécanismes moléculaires pour contrôler la force des jonctions endothéliales et moduler la perméabilité vasculaire. Ces mécanismes ciblent l'organisation des jonctions adhérentes et particulièrement la VE-cadhérine. Parmi ces mécanismes qui modulent la fonction de la VE-cadhérine, il y a principalement la phosphorylation sur tyrosine ou sérine de son domaine cy-

toplasmique, le clivage de son domaine extracellulaire et son internalisation par endocytose (voir Figure III.10). Nombre de médiateurs, tels que des facteurs de croissance, des cytokines inflammatoires ou encore des hormones, ont été décrits *in vitro*, et *in vivo* dans certains modèles pathologiques comme pouvant être à l'origine de ces différents mécanismes qui modulent l'activité de la VE-cadhérine.

III.3.6.1 Phosphorylation du complexe de VE-cadhérine

III.3.6.1.1. Généralités sur la phosphorylation de la VE-cadhérine

La phosphorylation sur tyrosine des protéines des jonctions adhérentes des cellules endothéliales a été décrite dans les années 1998-99 et était connue pour être associée à une perturbation de la fonction de

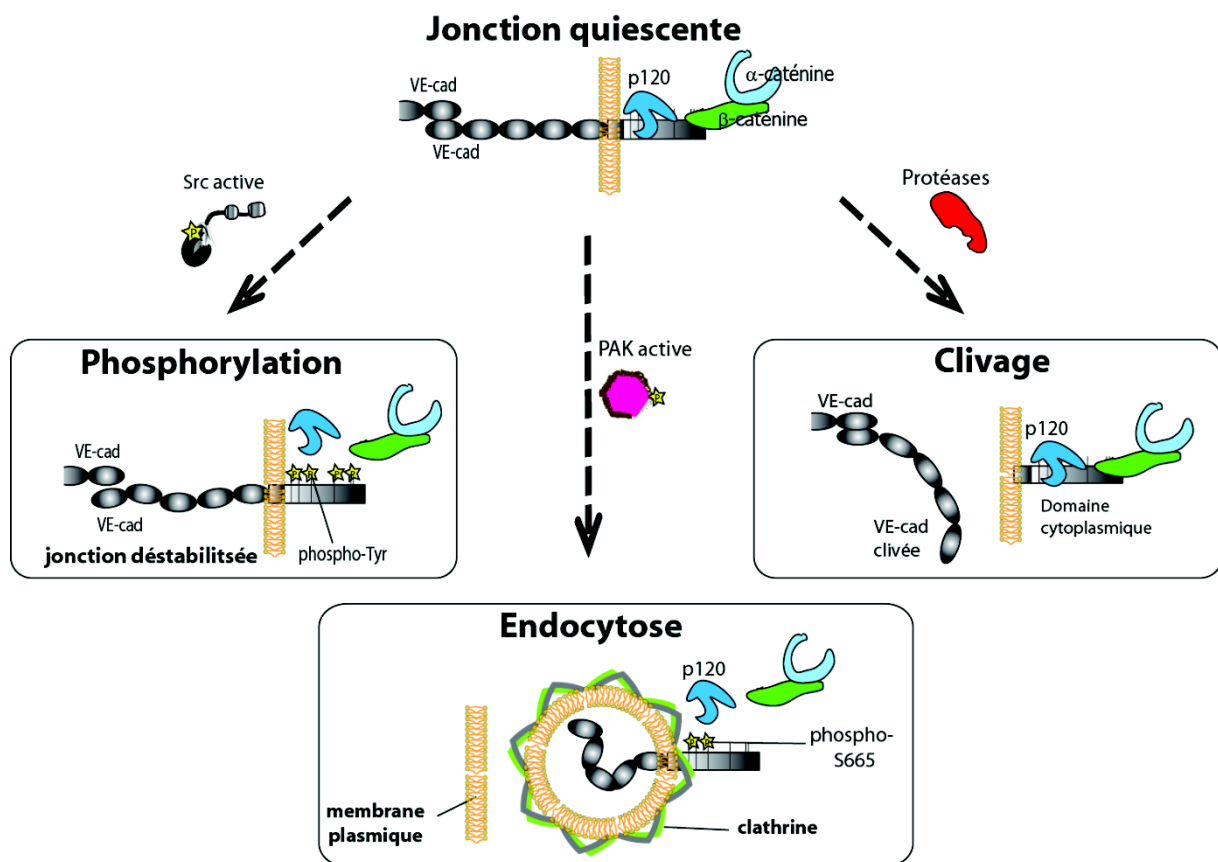


Figure III.10: Régulation de l'intégrité de la barrière endothéliale par la VE-cadhérine. La phosphorylation de la VE-cadhérine sur tyrosine a été associée à une déstabilisation des jonctions et une augmentation de la perméabilité, la tyrosine Src est impliquée dans ce processus ; l'endocytose de la VE-cadhérine diminue la force des jonctions et induit la perméabilité, la phosphorylation de la sérine S665 par PAK participe activement à ce mécanisme ; et le clivage du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine par des protéases participerait à l'émigration des leucocytes et la perméabilité, l'élastase, la cathepsine G, les métalloprotéases comme ADAM-10 ou MMP-2 sont impliquées dans ce processus.

barrière endothéliale. Depuis, de nombreux travaux ont rapporté des conclusions confortant ce constat. Parmi les protéines cibles des jonctions endothéliales, la phosphorylation de la VE-cadhérine a été largement étudiée depuis les années 2003-2005. En effet, des agents inducteurs de perméabilité vasculaire comme l'histamine, le $\text{TNF}\alpha$, le VEGF ou le PAF (platelet-activating factor) induisent la phosphorylation de la VE-cadhérine et de ses partenaires cytoplasmiques dont la β -caténine, la plakoglobine et la caténine p120 (Esser, Lampugnani et al. 1998, Shasby, Ries et al. 2002, Hudry-Clergeon, Stengel et al. 2005, Angelini, Hyun et al. 2006). Des hormones telles que le 17- β -estradiol induisent la phosphorylation de la VE-cadhérine sur tyrosine et sensibilisent les cellules endothéliales au VEGF augmentant ainsi leur activité angiogénique (Groten, Pierce et al. 2005). Indépendamment de facteurs isolés, l'adhérence des leucocytes à l'endothélium est aussi un processus qui est suffisant pour induire la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine et qui est corrélée à la transmigration leucocytaire par voie paracellulaire (Allingham, van Buul et al. 2007, Turowski, Martinelli et al. 2008). Ces observations sont donc en faveur d'une relation entre la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine et l'ouverture des jonctions intercellulaires.

Cependant les résultats des travaux menés par l'équipe de P Vincent semblent indiquer que la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine n'est pas un mécanisme suffisant, pour provoquer la dissociation des jonctions intercellulaires au point d'induire une augmentation de la perméabilité (Adam, Sharenko et al. 2010). Ces résultats relancent les investigations concernant le rôle de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine *in vitro* comme *in vivo*. En effet toutes ces études sur la phosphorylation de la VE-cadhérine, évoquées jusque-là, ont été réalisées *in vitro*.

Néanmoins des études menées *in vivo* ont aussi montré l'existence de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine au cours de l'angiogénèse ou avec la perméabilité vasculaire. En effet, il a été montré au laboratoire dans un modèle d'induction de l'angiogénèse ovarienne ou utérine stimulée avec le PMSG/hCG (pour pregnant mare serum gonadotropin/ human chorionic gonadotropin). Ce modèle d'angiogénèse a été décrit chez la ratte par l'équipe de GD Yancopoulos qui a montré la distribution de l'ARNm de VEGF au cours du remodelage vasculaire dans l'ovaire de rattes stimulées par ces hormones. Ce modèle était idéal pour étudier *in vivo* la phosphorylation de la VE-cadhérine dans un environnement soumis à VEGF de façon hormono-dépendante. Ainsi il a été montré au laboratoire par transposition de ce modèle chez la souris que la stimulation hormonale induit la phosphorylation de la VE-cadhérine sur tyrosine (Lambeng, Wallez et al. 2005). Ce résultat indique une corrélation entre la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine et le processus angiogénique qui a lieu sous l'effet des hormones. Cela suggère que cette modification de la VE-cadhérine pourrait avoir lieu dans les conditions angiogéniques endogènes comme au cours du cycle ovarien. Les travaux de Weis et al ont aussi montré *in vivo*, dans un modèle d'ischémie cardiaque chez la souris, que la phosphorylation de la VE-cadhérine était corrélée à une augmentation de la perméabilité vasculaire qui s'est manifesté en

entraînant l'apparition d'œdème (Weis, Shintani et al. 2004). Pour autant, ni les résidus tyrosine phosphorylés, ni leurs effets exacts sur l'angiogénèse ou la perméabilité n'ont été analysés jusque-là.

La phosphorylation sur sérine est également un mécanisme proposé dans la régulation des fonctions biologiques de la VE-cadhérine. Moins largement documenté, le phénomène a pourtant aussi été décrit *in vitro* en réponse à VEGF (Gavard and Gutkind 2006). Ce processus est déclenché par l'activation de la petite GTPase Rac par VEGFR-2 suite à la phosphorylation Src-dépendante de Vav2, un facteur d'échange nucléotidique. L'activation de Rac, à son tour, favorise la phosphorylation d'un motif hautement conservé dans le domaine cytoplasmique (Ser 665) de la VE-cadhérine par la kinase PAK activée. Il s'ensuit le recrutement de la β -arrestine2 au niveau de la sérine phosphorylée de la VE-cadhérine, favorisant ainsi son internalisation dans les vésicules à clathrine et par voie de conséquence la dissociation des jonctions endothéliales. Ce schéma propose donc une voie alternative par laquelle le VEGF déclencherait la perméabilité endothéliale par l'endocytose de la VE-cadhérine de façon dépendante de la β -arrestine2. Le lien potentiel entre ces deux types de modifications (phosphorylation sur sérine et sur tyrosine) de la VE-cadhérine serait la kinase Src. Mais il faudrait toutefois s'appuyer sur des études *in vivo* pour confirmer cet effet de VEGF sur la perméabilité induite par l'intermédiaire de la phosphorylation sur sérine de la VE-cadhérine.

Globalement la dissociation de jonctions endothéliales est associée à un mécanisme de phosphorylation de la VE-cadhérine mais aussi des autres protéines associées y compris la β -caténine dont l'affinité pour la VE-cadhérine diminue quand elle est phosphorylée. Il reste donc difficile à l'heure actuelle de déterminer le rôle respectif de chaque protéine phosphorylée dans le mécanisme de dissociation des jonctions endothéliales.

III.3.6.1.2. Sites de phosphorylation de la VE-cadhérine

Le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine humaine comporte 9 acide aminés tyrosine (Tyr), 14 acides aminés sérine (Ser) et 5 acide aminés thréonine (Thr), tous potentiellement phosphorylables (Breviario, Caveda et al. 1995, Ali, Liao et al. 1997). Chez la souris il y a 8 Tyr, 16 Ser et 9 Thr (Breier, Breviario et al. 1996, Matsuyoshi, Toda et al. 1997). Certains de ces résidus sont conservés entre l'Homme et la souris montrant leur importance potentielle dans la physiologie de l'endothélium et particulièrement dans la modulation du rôle de la VE-cadhérine (Figure III.11). Pour autant seules quelques tyrosines (Y645, Y658, Y685, Y731 et Y733) et une sérine (S665) ont été identifiées pour l'instant comme étant phosphorylables sous l'effet de stimuli *in vitro* (voir table III-1). En plus tous ces sites sont conservés entre l'Homme et la souris suggérant un rôle pour chacun de ces résidus tout au long de l'évolution.

La première étude sur les sites de phosphorylation de la VE-cadhérine a été conduite par l'équipe de D Cheresch qui a réalisé des mutations de tous les résidus tyrosine (Y) du domaine cytoplasmique de la protéine par l'acide glutamique (E). Ce type de mutation a pour but de mimer les charges négatives apportées normalement par le groupement phosphate de la réaction de phosphorylation. Les protéines

mutantes ont été transfectées dans des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO : chinese hamster ovary) (Potter, Barbero et al. 2005). Avec ce procédé, les auteurs ont pu montrer que la phosphorylation des Y658 et Y731 induisait le détachement de la caténine p120 et de la β -caténine respectivement, entraînant un affaiblissement des jonctions adhérentes.

Une deuxième étude réalisée concomitamment au laboratoire, a utilisé des peptides synthétiques de 10 AA encadrant chaque tyrosine du domaine cytoplasmique de la protéine. Ces peptides ont été soumis à une phosphorylation in vitro par Src actif en présence de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP et MgCl_2 . De façon intéressante, un seul peptide a été phosphorylé par Src, celui contenant le site Y685, reflétant sans doute une forte affinité enzyme-substrat. Dans les cellules endothéliales et par marquage métabolique au $^{32}\text{PO}_4$, puis stimulation des HUVEC par VEGF et immunoprécipitation de la VE-cadhérine, l'analyse de la carte peptidique de la VE-cadhérine a permis d'identifier le site Y685 comme site phosphorylé dans la protéine (Wallez, Cand et al. 2007). Cette préférence de Src pour ce site Y685 est intéressante dans le sens où cela suggère un rôle de premier plan pour cette tyrosine de la VE-cadhérine dans les processus cellulaires médiés par le VEGF. La même année, il a été rapporté que ce site Y685 phosphorylé devient un domaine de liaison pour la tyrosine kinase Csk qui participe ainsi à l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales (Baumeister, Funke et al. 2005). En plus de la tyrosine Y685 impliquée dans la voie VEGF-dépendante, Gavard et al ont montré que la sérine S665 de la VE-cadhérine était une cible pour la serine kinase PAK activée sous l'action du VEGF conduisant à l'endocytose de la VE-cadhérine.

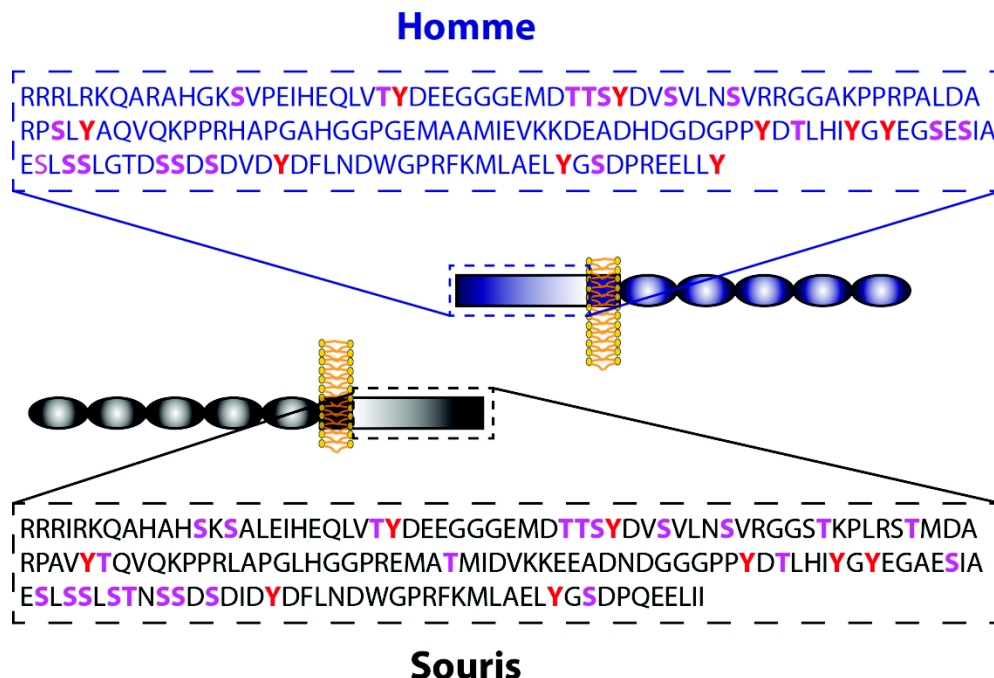


Figure III.11: Comparaison des séquences du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine chez l'Homme et la souris. Les résidus sérine/thréonine sont en rose alors que les tyrosines sont en rouge

Table III-1: Sites de phosphorylation de la VE-cadhérine

Site de phosphorylation	Stimuli	Voie de signalisation en amont	Protéines s'associant ou se dissociant	Références
Y645	Lymphocytes	ICAM-1/Rho GTPase	Non-connu	(Turowski, Martinelli et al. 2008)
Y658	Leucocytes, VEGF, TNF α	KDR/Src ; ICAM-1/Src/PYK-2; TNFR/SYK	Caténine p120	(Allingham, van Buul et al. 2007, Dejana, Orsenigo et al. 2008, Thèse Mannic 2009)
S665	VEGF	KDR/Src/Vav2/Rac/PAK	B-arrestine	(Gavard and Gutkind 2006)
Y685	VEGF	KDR/Src	CSK	(Wallez, Cand et al. 2007)
Y731	Leucocytes	ICAM-1/Rho GTPase, ICAM-1/Src/PYK-2	β -caténine	(Allingham, van Buul et al. 2007, Turowski, Martinelli et al. 2008)
Y733	Leucocytes	ICAM-1/Rho GTPase	β -caténine	(Turowski, Martinelli et al. 2008)

Au laboratoire, des études avec une autre cytokine, le TNF α , ont montré la phosphorylation de la VE-cadhérine sur le site Y658 par l'intermédiaire de la tyrosine kinase SYK (spleen tyrosine kinase), indiquant une certaine spécificité entre stimuli et site phosphorylé (Thèse Mannic 2009).

La transmigration leucocytaire est un autre événement dans l'inflammation qui impacte la VE-cadhérine et participe à sa phosphorylation sur certaines tyrosines détectées par des anticorps qui ont été développés contre les sites phosphorylés. Cette stratégie technique est une approche de plus en plus fréquente dans l'identification de sites de phosphorylation de nombreuses protéines que cela soit sérine, thréonine ou tyrosine. Ainsi, l'adhérence des neutrophiles sur les cellules endothéliales via ICAM-1 induit la phosphorylation de Y658 et Y731 par Src (Allingham, van Buul et al. 2007), alors que l'adhérence des lymphocytes via ICAM-1 induit la phosphorylation des tyrosines Y645, Y731 et Y733 de la VE-cadhérine (Turowski, Martinelli et al. 2008). De plus, l'expression de formes de VE-cadhérine, mutée individuellement sur ces sites dans les cellules endothéliales n'exprimant plus de VE-cadhérine endogène, a montré une forte diminution de la transmigration des lymphocytes. Il apparaît ici que deux types cellulaires différents interagissant avec l'endothélium via ICAM1 activent sans doute des voies de signalisation intracellulaires n'impliquant pas les mêmes kinases et les mêmes sites de phosphorylation sur la VE-cadhérine. Les voies conduisant à la phosphorylation de la VE-cadhérine sont complexes à tel point qu'en 2010, le groupe de PA Vincent a décidé d'essayer de comprendre le rôle de chaque tyrosine phosphorylée de la VE-cadhérine dans la perméabilité endothéliale et a montré qu'aucune des phosphorylations de la VE-cadhérine, à elle seule, n'était suffisante pour induire la perméabilité endothéliale in vitro (Adam, Sharenko et al. 2010). Le débat reste ouvert sur l'effet de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine de même que les techniques utilisées pour appréhender

der la question. En effet souvent une seule technique est utilisée : soit l'approche phospho-sites, soit l'approche mutagénèse dirigée (phosphomimétique), soit l'approche activation de Src par inhibition de Csk. Il est donc difficile à l'heure actuelle de se faire une idée claire de la régulation fonctionnelle de la phosphorylation de chaque site et de son rôle dans les grandes fonctions de la VE-cadhérine sans une approche *in vivo*.

III.3.6.2 Internalisation de la VE-cadhérine

Parmi les mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation de l'expression de la VE-cadhérine à la surface des cellules endothéliales, les processus d'internalisation de la protéine ont été décrits dès les années 1994 pour lesquels les mécanismes cellulaires ont été documentés. Afin de mieux étudier la régulation du turnover de la VE-cadhérine, sa localisation a été examinée en présence ou en absence de chloroquine, molécule qui empêche l'acidification des endosome-lysosome et prévient la dégradation lysosomale de la VE-cadhérine sans empêcher son internalisation. En présence de chloroquine, la VE-cadhérine est retrouvée dans les lysosomes ce qui a suggéré que la protéine était internalisée et constitutivement dégradée par une voie endosomale-lysosomale. Ce processus nécessite des manteaux de clathrine (Xiao, Garner et al. 2005). L'association de la caténine p120 à la VE-cadhérine prévient cette internalisation, introduisant une nouvelle notion dans le rôle de la caténine p120. Elle agirait comme un signal de rétention de la VE-cadhérine à la membrane. Mais cette idée doit être vérifiée avec d'autres cadhérines, si en absence de p120 elles sont internalisées plus facilement. Les travaux de Gavard et al, comme évoqué précédemment, ont montré que l'activation de Src par le VEGF entraîne la phosphorylation de VAV2, un facteur d'échangeur de GTP/GDP, qui à son tour active Rac en échangeant son GDP par un GTP (Gavard and Gutkind 2006). Cette activation conduit à la phosphorylation de la VE-cadhérine sur S665 par PAK, puis au recrutement de la β -arrestine-2 qui entraîne l'endocytose de la VE-cadhérine. D'après ce scénario, l'internalisation de la VE-cadhérine et l'augmentation subséquente de la perméabilité endothéliale passeraient par sa phosphorylation sur sérine et non sur tyrosine. Bien que ce schéma soit concevable pour la rupture physique des jonctions endothéliales induite par le VEGF, pour expliquer l'augmentation transitoire de la perméabilité endothéliale, il y a peu de données disponibles pouvant corroborer cette internalisation *in vivo*. En plus il faudra chercher à savoir si d'autres agents inducteurs de perméabilité ont le même effet sur la phosphorylation de la VE-cadhérine sur S665 et s'ils entraînent tous l'internalisation de la protéine par cette même voie d'endocytose.

III.3.6.3 Clivage de la VE-cadhérine

Le troisième mécanisme modulant l'expression de la VE-cadhérine à la surface des cellules endothéliales est le clivage du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine. En fait, ce domaine est très sensible à la protéolyse et il y a quelques années, le clivage de la VE-cadhérine a été montré sous l'action de protéases libérées par les neutrophiles pour faciliter la transmigration leucocytaire (Carden, Xiao et

al. 1998). Plus récemment le fragment protéique de 90 kDa correspondant à ce domaine a été détecté dans des extraits protéiques de tissus ainsi que dans des sérums humains. Les processus de clivage de la VE-cadhérine impliquent un certain nombre de protéases incluant les activités élastase et cathepsine G sécrétées par des neutrophiles activés (Hermant, Bibert et al. 2003) mais aussi d'autres protéases parmi lesquelles les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP : matrix metalloproteinase) et les adamalysines (ADAM : A desintegrin and metalloproteinase). En effet la protéolyse de la VE-cadhérine par les MMP-2, -7 et -9 a été rapportée dans divers contextes dont l'apoptose des cellules endothéliales, la rétinopathie diabétique, le syndrome d'hyperstimulation ovarienne et l'infection au virus de la dengue (Herren, Levkau et al. 1998, Luplertlop, Misse et al. 2006, Navaratna, McGuire et al. 2007, Villasante, Pacheco et al. 2008). Les travaux d'Ichikawa et al ont montré que la matrilysine (MMP-7) dégrade la VE-cadhérine et accélère l'accumulation de la β -caténine dans le noyau suggérant que ce processus pourrait avoir une implication dans la prolifération cellulaire et la modulation de la voie Wnt (Ichikawa, Ishikawa et al. 2006). Par contre, l'activité protéasique MMP-2 rapportée par Wu et al serait impliquée dans le clivage de la VE-cadhérine au cours de l'apoptose des cellules endothéliales induite par le venin de serpent (Wu and Huang 2003).

En plus des MMPs, les protéases de la famille ADAMs (-9, 10) induisent le clivage de la VE-cadhérine au cours de la néovascularisation rétinienne mais aussi de la modification de perméabilité (Guaiquil, Swendeman et al. 2009). En fait, Schulz et al ont montré que la protéase ADAM-10, sous l'action de la thrombine et de l'entrée de calcium, peut cliver la VE-cadhérine et générer un fragment protéique de 35 kDa composé des domaines cytoplasmiques et transmembranaires, ce qui constituerait l'un des mécanismes principaux d'induction de la perméabilité endothéliale par la thrombine (Schulz, Pruessmeyer et al. 2008) (voir Figure III.11), mais aussi un mécanisme d'ouverture des jonctions intercellulaires nécessaire à la transmigration leucocytaire par la voie paracellulaire (Schulz, Pruessmeyer et al. 2008). Le poids moléculaire des fragments extracellulaires de VE-cadhérine clivée sous l'action des différentes protéases est loin d'être complètement élucidé et l'identification précise des sites de coupures reste à déterminer.

III.4 Conclusion

Les jonctions intercellulaires endothéliales sont des structures dont le rôle est le maintien de l'intégrité de l'endothélium. Des études récentes ont montré que, en plus de la promotion de l'adhésion cellule-cellule, les jonctions peuvent transférer des signaux intracellulaires qui régulent l'inhibition de la croissance cellulaire, l'apoptose, l'expression des gènes et la formation de nouveaux vaisseaux. En outre, des modifications de l'organisation moléculaire et de la signalisation intracellulaire des protéines jonctionnelles pourraient avoir des effets complexes sur l'homéostasie vasculaire. Le rôle des jonctions intercellulaires endothéliales est capital pour garder l'intégrité de l'endothélium vasculaire et la composition des contacts intercellulaires varie en fonction du type d'endothélium et de leur rôle au

sein de chaque lit vasculaire. Les jonctions serrées sont l'élément essentiel de la barrière hémato-encéphalique fermant pratiquement la voie de transport paracellulaire alors que les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes sont d'autres types de jonctions rencontrées dans les différents lits vasculaires de l'organisme. Ainsi, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées interagissent entre elles et la VE-cadhérine régule l'expression de la claudine-5 qui est la protéine majeure des jonctions serrées. Les altérations de l'activité adhésive de la VE-cadhérine peuvent avoir des conséquences dramatiques sur l'intégrité des vaisseaux sanguins. Ainsi, la modulation fine de la fonction de la VE-cadhérine par différents mécanismes, comme la phosphorylation, l'internalisation ou encore le clivage de la molécule, peuvent faire partie de la réponse de l'endothélium à la réparation tissulaire ainsi que la transmigration leucocytaire au cours de l'inflammation renforçant l'intérêt des modifications structurales de cette protéine dans différentes pathologies.

Chapitre IV: Pathologies vasculaires associées à un dysfonctionnement endothélial

Sommaire

CHAPITRE IV: PATHOLOGIES VASCULAIRES ASSOCIEES A UN DYSFONCTIONNEMENT ENDOTHELIAL.....	96
<i>IV.1 Introduction</i>	96
<i>IV.2 Exemple d'une maladie inflammatoire : la polyarthrite rhumatoïde (PR)</i>	97
IV.2.1 Généralité sur la PR	97
I.1.2. Physiopathologie de la PR.....	97
IV.2.2 Syndromes associés à la PR.....	99
IV.2.3 Implication de l'endothélium dans la PR et l'athérosclérose associée	100
IV.2.4 Diagnostic de la PR	101
IV.2.5 Traitements de la PR et évaluation de la réponse.....	102
IV.2.6 Modèles d'étude de la PR chez la souris.....	108
IV.2.7 Conclusion :	109
<i>IV.3 Syndrome d'hyperstimulation ovarienne :</i>	110
IV.3.1 Généralité sur l'OHSS	110
IV.3.2 Mécanismes	111
<i>IV.4 Dysfonction endothéliale et autres pathologies</i>	111
I.1.3. Les ischémies	111
IV.4.1 Les maladies inflammatoires à tropisme pulmonaire.....	112
IV.4.2 Pathologies oculaires	112
<i>IV.5 Conclusion</i>	112

IV.1 Introduction

De façon très générale la dysfonction endothéliale est associée à un certain nombre de pathologies telles que l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose, le cancer, la rétinopathie diabétique, les fibroses, la polyarthrite rhumatoïde ainsi que des syndromes iatrogéniques comme l'hyperstimulation ovarienne induite par la fertilisation in vitro. Une caractéristique majeure retrouvée dans ces diverses pathologies est une dysfonction de la barrière endothéliale avec des altérations de certaines protéines des jonctions intercellulaires endothéliales, associée à une désorganisation des structures jonctionnelles et une augmentation de la perméabilité vasculaire et du trafic leucocytaire.

Dans ce chapitre nous allons voir essentiellement la polyarthrite rhumatoïde et le syndrome d'hyperstimulation ovarienne mais également d'autres cas de dysfonctionnement de la barrière endothéliale sont également traités.

IV.2 Exemple d'une maladie inflammatoire : la polyarthrite rhumatoïde (PR)

IV.2.1 Généralité sur la PR

La PR est une maladie autoimmune, caractérisée par le gonflement et la douleur d'une ou de plusieurs articulations qui sont le siège d'une inflammation chronique pouvant conduire à la destruction des articulations (Smolen and Steiner 2003). Cette maladie est complexe et multifactorielle dont l'évolution est imprévisible (voir Figure IV.1). Généralement, les articulations les plus affectées sont celles des mains, des pieds et des genoux. La PR est une pathologie très handicapante aussi bien sur le plan social que professionnel, qui s'accompagne d'un risque cardiovasculaire élevé associé dû à l'athérosclérose, complication majeure de la PR, avec les conséquences d'obstruction des artères coronariennes et d'infarctus du myocarde bien connus. Il est donc crucial à l'heure d'aujourd'hui de trouver des marqueurs de l'atteinte vasculaire prédictive de l'athérogenèse et de développer des moyens efficaces pour les détecter pour une meilleure prise en charge des patients.



Figure IV.1: Morphologie de mains polyarthritiques, (d'après Moll 1995)

IV.2.2 Physiopathologie de la PR

La PR a une prévalence estimée entre 0,3 et 0,8 % de la population adulte avec un âge moyen du début de la pathologie vers 50 ans et une fréquence trois fois plus importante chez la femme à cet âge mais cette différence de *sex ratio* s'atténue progressivement au-delà de 70 ans. Il existe cependant une forme juvénile qui touche un enfant sur 1000 âgé de moins de 16 ans. Les origines initiales du déclenchement de la pathologie de même que les mécanismes moléculaires de la localisation articulaire de la réponse immuno-inflammatoire demeurent inconnus. Pendant longtemps l'implication d'agents infectieux ayant un tropisme articulaire a été suggérée sans pour autant avoir été réellement démontrée (Silman and Pearson 2002). Toutefois, la recherche a permis des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes, montrant que la PR relève de facteurs génétiques, hormonaux, environ-

nementaux, neuropsychologiques et immunologiques. La lésion élémentaire responsable de la destruction articulaire est liée à des anomalies de l'immunité à médiation cellulaire, avec activation des lymphocytes T et comporte plusieurs phases qui caractérisent l'évolution de la pathologie : initiation, recrutement leucocytaire et inflammation, prolifération des synoviocytes, destruction de l'articulation.

IV.2.2.1 Phase d'initiation

Les premiers événements pourraient être initiés par les synoviocytes fibroblastiques qui provoquent une réponse inflammatoire conduisant à l'accumulation locale de monocytes/macrophages. L'implication d'autoantigènes situés dans l'articulation tels que le collagène de type 2, les protéoglycanes, ou encore d'autres protéines de la matrice extracellulaire a été proposée mais aussi des peptides d'origine exogène, issus de bactéries ou de virus.

IV.2.2.2 Infiltration des lymphocytes

Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans la pathogenèse de la PR : les cellules T et B, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et les fibroblastes entre autres. Ces cellules sont retrouvées en nombre dans la membrane synoviale de patients arthritiques. Le processus inflammatoire est donc initié par les macrophages qui recrutent des lymphocytes T et des polynucléaires, du fait de leur sécrétion de cytokines à activité chimiotactique. Les macrophages interagissent in situ avec les lymphocytes T en leur présentant des peptides antigéniques associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les lymphocytes T infiltrés sont des cellules mémoire CD4⁺ qui se polarisent en cellules T auxiliaires 1 ou Th1 (pour T helper 1) par un effet autocrine de l'interleukine 12 (IL-12) et de l'interféron- γ qu'elles sécrètent (Steiner, Tohidast-Akrad et al. 1999, Fritsch, Eselböck et al. 2002). La participation des cellules dendritiques est très importante pour la polarisation de cellules Th1 qui, à leur tour, activent des lymphocytes B afin qu'ils produisent les autoanticorps et les macrophages qui sécrètent des cytokines proinflammatoires comme le TNF α , l'IL-1 et l'IL-6 (Stout and Suttles 1997, Santiago-Schwarz, Anand et al. 2001). La production de ces cytokines constitue l'évènement majeur qui est à la base de l'inflammation chronique (Smolen and Steiner 2003). Ces activations cellulaires en cascade, de même que la production accrue de cytokines et de molécules effectrices, amplifient l'inflammation locale et provoquent des destructions tissulaires (Armant and Fenton 2002, Dobrovolskaia and Vogel 2002). Ces cellules immunitaires activées migrent de la circulation sanguine vers la membrane synoviale pour participer à la production des cytokines importantes pour le développement pathogénique. L'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales induite par le TNF- α participe activement cette transmigration des leucocytes.

L'endothélium joue donc un rôle actif et majeur dans cette étape de la pathogenèse de par l'expression et le changement structural de certaines protéines des jonctions endothéliales crucial pour l'étape de

transmigration leucocytaire (Mehta and Malik 2006). Les cytokines proinflammatoires jouent un rôle pathogénique clef sur les processus d'inflammation, de prolifération synoviale et de destruction du cartilage. Parmi elles, le $\text{TNF}\alpha$ occupe une place de premier plan car il induit la sécrétion de l'IL-1 et l'IL-6, et l'IL-1 peut aussi induire l'expression de $\text{TNF}\alpha$ (Dinarello, Cannon et al. 1986, Smolen and Steiner 2003). Il existe dans l'articulation rhumatoïde un déséquilibre entre les cytokines à action proinflammatoire, comme le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-1 et l'IL-6, et les cytokines à action anti-inflammatoire, représentées par l'IL-10, l'IL-4, l'IL-13, les récepteurs solubles du $\text{TNF}\alpha$ et l'antagoniste du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1-RA), en quantité insuffisante pour contrebalancer l'action des premières. Des cytokines favorisant l'angiogénèse et la prolifération cellulaire sont également trouvées dans la membrane synoviale: VEGF, PDGF, FGF-1 et -2, et $\text{TGF}\beta$. Cette angiogénèse est indispensable au recrutement des lymphocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles sanguins. Ces cytokines et leurs récepteurs sont des cibles thérapeutiques particulièrement importantes.

IV.2.2.3 Formation du pannus

Les lésions observées initialement sont dues à une atteinte microvasculaire et à un infiltrat périvasculaire par des cellules myéloïdes, puis des lymphocytes. L'atteinte vasculaire, segmentaire ou focale, inclut des microthromboses et une néovascularisation. Une hyperplasie des cellules synoviales est aussi observée et le tissu synovial inflammatoire et prolifératif, ou « pannus », tend à recouvrir le cartilage articulaire et serait le siège de la production d'enzymes, responsables de la destruction du cartilage et de l'os (voir Figure IV.2). La présence du pannus a un effet très délétère pour les cartilages et les os des articulations du fait d'une abondante sécrétion de protéases de la famille des MMPs capables de dégrader le cartilage et initier la déformation des articulations. La néovascularisation très active au sein du pannus est due à une hypoxie au sein du tissu qui est responsable de la production de facteurs proangiogéniques comme le VEGF (Folkman 1995, Smolen and Lipsky 2002, Szekanecz and Koch 2008) (voir Figure IV.3). Ainsi, bloquer l'effet de VEGF dans la PR pour inhiber la néovascularisation, empêcher la croissance du pannus, prévenir la production de protéases et la dégradation du cartilage, pourrait être une nouvelle alternative thérapeutique. Cette stratégie a déjà montré son intérêt chez la souris dans un modèle d'arthrite induite par injection de collagène ou CIA (pour collagen-induced arthritis) (Sone, Kawakami et al. 2001).

IV.2.3 Syndromes associés à la PR

Des affections pulmonaires, cardiovasculaires, neurologiques et cutanées secondaires à la PR initiales peuvent apparaître au cours de l'évolution de la pathologie et contribuent à l'augmentation de la mortalité, surtout quand elles sont asymptomatiques ou non identifiées (Michaud and Wolfe 2007). Ainsi, les infections pulmonaires, infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux sont fréquemment rencontrés, sans compter une athérosclérose accélérée liée aux atteintes cardiovasculaires (Crowson,

Nicola et al. 2005, Szekanecz, Kerekes et al. 2007). Il est important de pouvoir les identifier au plus tôt dans la maladie afin de pouvoir maîtriser en partie leur évolution et diminuer ainsi la mortalité.

IV.2.4 Implication de l'endothélium dans la PR et l'athérosclérose associée

L'endothélium vasculaire et particulièrement les jonctions endothéliales sont impliqués dans la pathogenèse de la PR, depuis les premières étapes pendant la transmigration leucocytaire, puis l'angiogénèse qui participe à la croissance du pannus jusqu'au dysfonctionnements endothéliaux et risques cardiovasculaires associés (Szekanecz and Koch 2008).

IV.2.4.1 Endothélium et recrutement leucocytaire dans la PR

En plus de l'interaction et de la transmigration des leucocytes, l'inflammation de la membrane synoviale est associée à une vasodilatation et à une augmentation de la perméabilité endothéliale (Cotran and Pober 1990), du fait de la production de prostacycline (PGI_2) et de médiateurs de l'inflammation comme l'histamine, le $\text{TNF}\alpha$ ou la bradykinine (Cotran and Pober 1990). Ainsi les protéines d'adhérence intercellulaire du réseau vasculaire local et périphérique se voient très sollicitées au cours de ces étapes initiales de la PR et c'est là que les modifications structurales de la VE-cadhérine pourraient être des marques de l'endothélium agressé ou en remaniement.

IV.2.4.2 Cellules endothéliales et croissance du pannus

En plus de sa participation dans le processus inflammatoire, l'endothélium vasculaire a un rôle majeur dans la croissance du pannus en permettant sa néovascularisation. En fait au cours de la formation et du développement soutenu du pannus, comme expliqué ci-dessus, l'augmentation de l'hypoxie induit la production du facteur de croissance endothéliale, le VEGF, qui provoque la dissociation de jonctions endothéliales, la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Ce processus angiogénique permet au final l'approvisionnement du pannus en nutriments et en oxygène (Smolen and Lipsky 2002). Comme dans les tumeurs, l'angiogénèse est nécessaire pour la croissance et le maintien du pannus. L'inhibition de l'activité de VEGFR-1 a montré son effet protecteur contre la destruction des articulations dans le modèle K/BxN chez la souris (De Bandt, Ben Mahdi et al. 2003). Cela montre à quel point l'implication active de l'endothélium est cruciale pour la pathogenèse de la PR.

IV.2.4.3 Endothélium et athérosclérose dans la PR

L'agression de l'endothélium dans la PR peut aussi être causée par des espèces réactives de l'oxygène et des métalloprotéases sécrétés par les leucocytes activés (Szekanecz, Kerekes et al. 2007). En effet, les granulocytes peuvent générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), impliquant un complexe de molécules connues collectivement sous le nom de NADPH oxydase et le rôle central du NO dans la

pathogénèse de la PR a été suggéré. Les données cliniques, montrent que la membrane synoviale enflammée est une source prédominante de NO chez les patients atteints de PR, et que les cellules T de patients atteints de PR produisent 2,5 fois plus de NO que les cellules T d'un donneur sain. Expérimentalement, le blocage du TNF α diminue l'activité NO synthase dans les cellules mononuclées du sang périphérique, donc le NO est un médiateur potentiel dans l'initiation de l'hyperplasie synoviale mais son mécanisme reste à déterminer.

Un autre élément potentiellement impliqué dans l'agression de l'endothélium est la réaction immunitaire. En effet, les patients atteints de PR produisent des auto-anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques portés par le fragment Fc des IgG. Des épitopes antigéniques de reconnaissances de cellules endothéliales ont été proposés et des autoanticorps anti ADN et anti cellules endothéliales ont été décrits (Westphal, Boerbooms et al. 1994). Ces AECA pourraient jouer un rôle important dans la pathogénèse de la vascularite et des lésions vasculaires de différents organes. D'autres études sont nécessaires pour caractériser la nature des antigènes des cellules endothéliales qui réagissent avec les AECA et le rôle des AECA dans l'apparition de lésions vasculaires pouvant être liées au développement de l'athérosclérose et des syndromes vasculaires associés à la PR.

IV.2.5 Diagnostic de la PR

Etant donné le caractère rapide de l'évolution de la PR ainsi que le développement de ses comorbidités, il est nécessaire de la diagnostiquer le plus précocement possible afin de pouvoir mettre en œuvre un traitement de fond adapté dès les premiers mois. En effet, les destructions ostéocartilagineuses surviennent tôt dans l'évolution de la maladie (10 à 15% des PR ont des érosions osseuses après trois mois d'évolution, 30% à un an, 70% à trois ans et 95% à six ans) et sont irréversibles (Hulsmans, Jacobs et al. 2000, Machold, Stamm et al. 2002). Le diagnostic se fait par différentes approches complémentaires incluant l'examen morphologique des articulations des mains, la radiologie des os et cartilages et l'analyse biologique de certains facteurs dans le sérum des patients. Il est aussi important d'identifier les symptômes extra-articulaires à l'origine des comorbidités associées à la PR-

IV.2.5.1 Diagnostic macromorphologique

Le diagnostic de la PR doit être envisagé devant une polyarthrite évoluant depuis plus de six semaines, d'autant qu'elle atteint plusieurs articulations, qu'elle a un caractère symétrique et qu'il existe une raideur matinale d'au moins 30 minutes (Aletaha, Neogi et al. 2010). Ces seuls critères ne suffisent pas à confirmer l'existence d'une polyarthrite rhumatoïde. Il faut d'autres examens biologiques notamment pour s'assurer qu'il ne s'agit pas d'autres rhumatismes.

IV.2.5.2 Analyses biologiques

Les analyses biologiques réalisées sur les patients polyarthritiques sont basées sur l'évaluation de la vitesse de sédimentation (VS), la présence de protéine C-réactive ou CRP (pour C-reactive protein) et

la détection de certains anticorps (Smolen and Steiner 2003). Une VS élevée et un taux de CRP élevé indiquent le syndrome inflammatoire, cependant chez 40% des patients arthritiques, ces valeurs peuvent être normales (Pincus and Sokka 2009). Le caractère autoimmun de la PR est confirmé par la présence d'autoanticorps comme les facteurs rhumatoïdes qui sont des IgM (immunoglobuline M) dirigés contre le fragment Fc des IgG. Ce dosage présente une spécificité de 70% et avec une valeur égale à 0 au cours des six premiers mois d'évolution (Steiner 2002). En revanche, le dosage d'anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (CCP)-2 présente une sensibilité de 50% dans une PR débutante, et une spécificité élevée (97 %). L'évaluation de la fonction de l'endothélium pourrait servir surtout dans l'identification de comorbidité cardiovasculaire (Dessein, Joffe et al. 2005). En effet, le statut de la fonction endothéliale peut être considéré comme un indice intégré de tous les facteurs athérogènes et athéroprotecteurs pour les patients. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour évaluer la fonction endothéliale : l'échographie brachiale pour mesurer les réponses vasodilatatrices suite à une perfusion à l'acétylcholine et la quantification de biomarqueurs d'activation et de dysfonctionnement endothélial (VCAM-1, ICAM-1 ou les sélectines). Les taux sanguins élevés de ces molécules sont associés à des facteurs de risque cardiovasculaire.

IV.2.5.3 Examens radiologiques

Les radiographies standards des mains et des pieds font généralement partie du bilan initial réalisé devant un rhumatisme inflammatoire débutant mais leur valeur diagnostique pour la détection d'une PR débutante a été très peu étudiée. Les érosions semblent être le critère le plus fiable alors que la déminéralisation en bande qui fait aussi partie des critères de classification de l'ACR reste très controversée. L'échographie articulaire est une technique qui peut amener deux informations distinctes et importantes: d'une part objectiver les synovites d'autre part rechercher le caractère érosif de l'arthrite. L'imagerie par résonance magnétique permet une évaluation des lésions osseuses précoce, une description de la synoviale inflammatoire des articulations et des gaines tendineuses et permet de distinguer entre lésions inflammatoires actives et lésions synoviales chroniques fibreuses (Carli, Landais et al. 2009).

IV.2.6 Traitements de la PR et évaluation de la réponse

IV.2.6.1 Objectifs thérapeutiques

Les objectifs thérapeutiques de la PR sont assez ambitieux et consistent en :

1. La mise en place de traitement de fond adapté au tout début de la maladie ce qui nécessite un diagnostic relativement rapide (Haute Autorité de santé, 2008).
2. L'obtention, à court terme, d'une rémission précoce de la maladie correspondant à la disparition des symptômes arthritiques et la restauration des capacités fonctionnelles des articulations (Emery 2002).

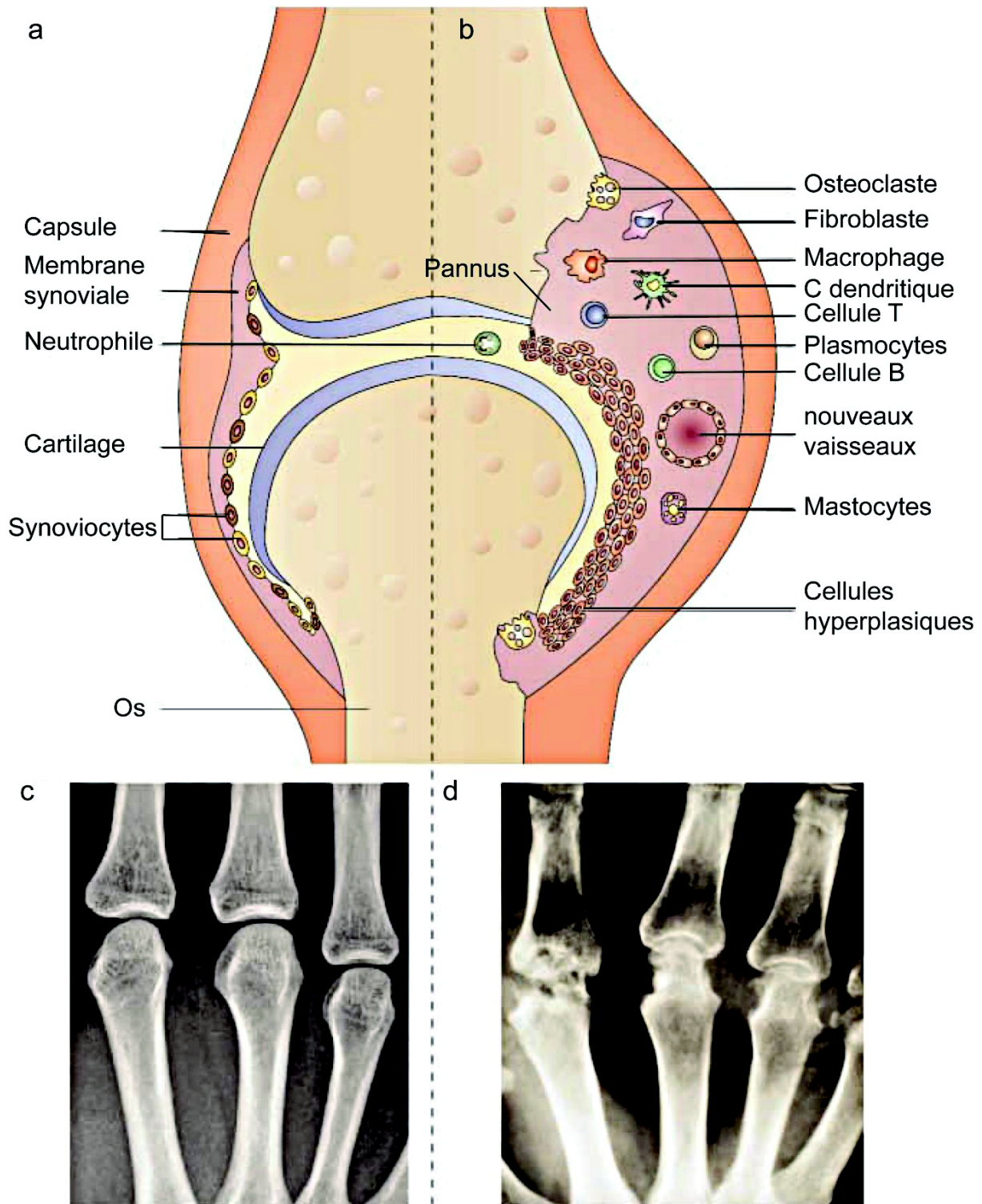


Figure IV.2: Représentation schématique et radiographie des structures articulaires normales et arthritiques, (modifié de(Smolen and Steiner 2003))

3. La prévention, à moyen et long terme, des érosions et des déformations articulaires afin de prévenir le handicap fonctionnel. Il vise également à réduire la mortalité en adoptant une attitude préventive vis-à-vis des risques infectieux et cardiovasculaires.

IV.2.6.2 Traitements

Le traitement médicamenteux de la PR repose sur l'utilisation de deux principales classes de médicaments : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) en traitement symptomatique et les DMARDs (pour disease modifying anti-rheumatic drugs) en traitement de fond.

IV.2.6.2.1. *Les AINS*

Les AINS sont généralement prescrits en première intention au cours des premières semaines d'évolution d'une PR, avant l'établissement définitif du diagnostic. Ces molécules sont efficaces sur les douleurs, les gonflements et la raideur matinale, mais n'empêchent pas la progression de la maladie, et leur emploi est recommandé en association avec un traitement de fond (Singh, Furst et al. 2012). La plupart de ces AINS cible la production de prostaglandines par les cyclo-oxygénases mais n'ont pas d'effet sur les événements immuno-inflammatoires à l'origine de la PR (Carli, Landais et al. 2009).

IV.2.6.2.2. *Les DMARDs*

Les DMARDs visent à contrôler les manifestations inflammatoires cliniques de la maladie, et à freiner les destructions articulaires qui peuvent y être associées. L'effet de la plupart de ces médicaments ne se fait sentir qu'après plusieurs semaines voire plusieurs mois en réduisant significativement l'inflammation et les manifestations associées. Les DMARDs peuvent être divisés en deux sous-groupes, ayant des effets complémentaires, qui sont les petites molécules synthétiques et les agents biologiques (Singh, Furst et al. 2012).

2a. Les petites molécules

Certaines de ces molécules sont utilisées depuis les années 20 (le cas du sel d'or) et ont en commun la capacité de ralentir l'évolution de la maladie, par divers mécanismes, mais leur capacité à réduire ou stopper la progression structurale reste controversée (Smolen and Steiner 2003). L'un des exemples de choix de molécules utilisées pour traiter la PR est le méthotrexate (MTX) actuellement considéré comme le traitement de fond de référence de la PR (Singh, Furst et al. 2012). Durant les 20 dernières années, le MTX a démontré son efficacité sur l'activité de la maladie et sa capacité à réduire la progression des lésions articulaires structurales. Il est utilisé en première intention en monothérapie puis si il s'avère inefficace, il est associé à d'autres petites molécules DMARDs ou aux biothérapies.

2b. Biothérapies

Le rôle majeur des cytokines inflammatoires et l'implication de certaines molécules de surface cellulaire dans la pathogénèse de la PR, ont conduit au développement d'outils thérapeutiques très spécifiques de ces molécules. Ce sont des anticorps monoclonaux, des récepteurs solubles ou encore des protéines antagonistes qui peuvent être utilisés dans différentes stratégies thérapeutiques (Singh, Furst et al. 2012).

- 1- les anticorps monoclonaux tout comme les récepteurs solubles peuvent fixer les cytokines importantes (telles que le $\text{TNF}\alpha$ ou l' IL-1) et ainsi empêcher leur activité biologique.
- 2- les cytokines anti-inflammatoires comme les IL-4 , -10 et -13 peuvent inhiber la production ou

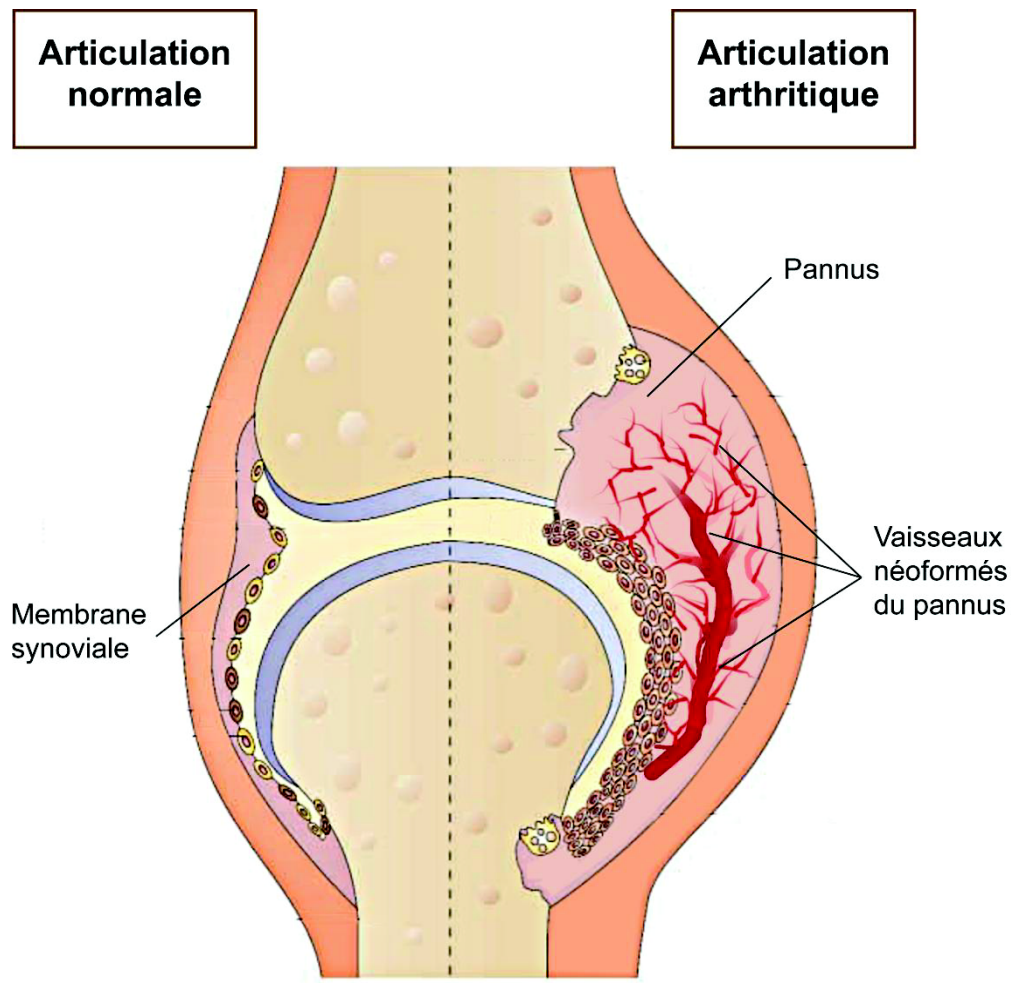


Figure IV.3: Néovascularisation du pannus articulaire chez les patients arthritiques, (modifié de (Smolen and Steiner 2003))

l'action de cytokines pro-inflammatoires.

3-les anticorps monoclonaux peuvent cibler des molécules spécifiques présentes à la surface d'un type cellulaire donné et ainsi permettre l'élimination de ces cellules ou de leur fonction. Parmi ces molécules utilisées en biothérapie, on peut citer les anti- $\text{TNF}\alpha$ et les anti- IL-1 .

2b.a. Biothérapies anti- $\text{TNF}\alpha$

Le rôle majeur du $\text{TNF}\alpha$ dans la pathogenèse de la PR en fait une cible thérapeutique importante et le blocage de son activité par capture du ligand est le principe du traitement. Il existe cinq anti- $\text{TNF}\alpha$ qui ont obtenu leur autorisation de mise sur le marché et de nombreux autres sont en cours d'essais cliniques [clinicalTrials.gov]. Parmi eux il y a la première biothérapie approuvée en 1998, l'Etanercept, qui est une protéine de fusion du TNFRII et du fragment Fc d'IgG1 (Smolen and Steiner 2003) tandis

que l'Infliximab (un anticorps chimérique approuvé en 1999) ainsi que l'Adalimumab (anticorps monoclonal humain, approuvé en 2002) sont des anticorps dirigés contre le $\text{TNF}\alpha$. Ces médicaments sont indiqués après une réponse insuffisante du traitement au MTX seul et leur efficacité a été bien démontrée. Cependant ces biothérapies présentent des effets secondaires qui peuvent être graves avec des risques infectieux comme des infections bactériennes, des infections pulmonaires sévères voire des septicémies (Singh, Furst et al. 2012). Des cas de tuberculose ont été rapportés surtout pendant les premiers essais thérapeutiques, mais également des risques d'induction de pathologies malignes. Il est donc primordial d'avoir des méthodes d'évaluation pour déterminer l'efficacité de ce type de composés.

2b.b. Biothérapie anti-IL-1

L'Anakinra est la forme recombinante de l'IL-1ra (IL-1 receptor antagonist), un antagoniste naturel de l'IL-1 (Arend, Malyak et al. 1998) qui est le seul des anti-IL-1 à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la PR en accompagnement du MTX. Les études ont permis d'observer une relative amélioration des symptômes et un ralentissement de la progression des lésions articulaires (Fleischmann, Schechtman et al. 2003). Cependant, il est estimé moins efficace que les anti- $\text{TNF}\alpha$ et n'est pas recommandé en cas d'échec de ceux-ci (Schiff 2005). Son utilisation peut provoquer une réaction cutanée érythémateuse au site d'injection chez 70% des patients traités. De plus, il existe un risque accru d'infections bactériennes sévères, surtout lorsque l'Anakinra est utilisé à fortes doses, mais il n'a pas été constaté d'augmentation du risque de tuberculose, ni d'infections opportunistes (Salliot, Dougados et al. 2009). L'Anakinra, dont la place reste mal définie dans la stratégie thérapeutique générale de la PR, est néanmoins un recours possible en cas de contre-indication aux anti- $\text{TNF}\alpha$.

2b.c. Autres biothérapies

D'autres molécules sont des cibles thérapeutiques dans la PR qui ont permis de développer deux grands groupes de médicaments: les traitements ciblant les cellules immunitaires (lymphocytes B ou T) et les traitements ciblant des cytokines ($\text{TNF}\alpha$, interleukine 1, interleukine 6...).

1. La molécule de surface des lymphocytes B, CD20, est ciblée par le Rituximab (RTX), un anticorps monoclonal qui permet de diminuer de façon substantielle le nombre de lymphocytes B par un effet toxique direct sur ces cellules. Le RTX peut être associé au MTX mais des risques associés de type infection pulmonaire ont été observés (Gottenberg, Ravaud et al. 2010).

2. L'activation des lymphocytes T est ciblée par l'Abatacept, un modulateur soluble du signal de costimulation CD80/CD86 qui diminue ainsi la production de certaines cytokines. Il s'agit d'une protéine soluble, résultant de la fusion entre un domaine extracellulaire de l'antigène humain CTLA-4 (cytotoxic *T-lymphocyte-associated antigen 4*) et la partie Fc modifiée (régions charnières CH2 et CH3) de l'immunoglobuline G1 humaine. L'abatacept est utilisé chez des patients ayant

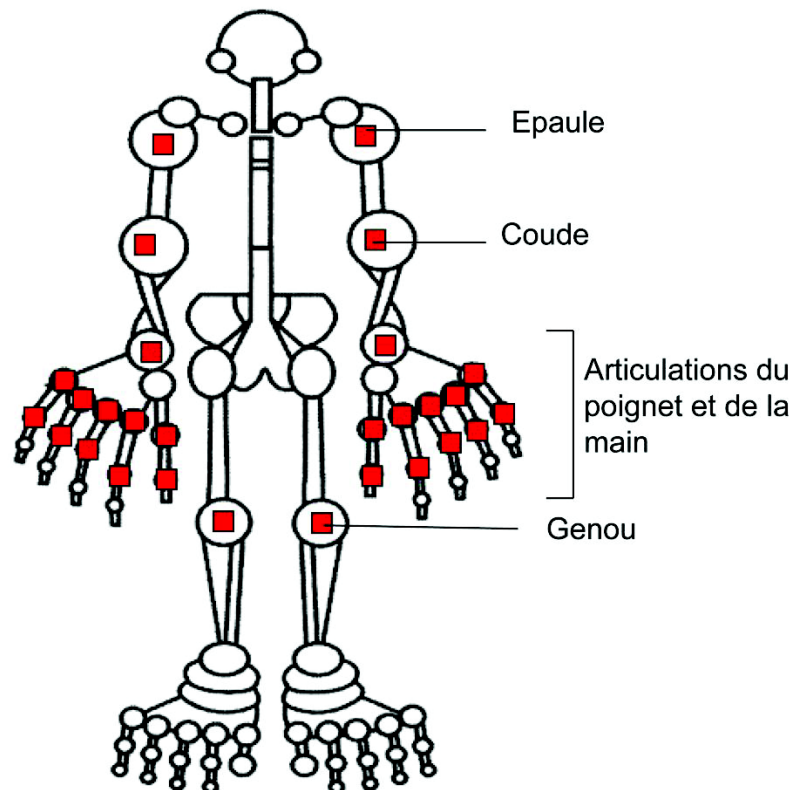


Figure IV.4 : Sites articulaires (28) dont le gonflement ou la douleur à la palpation sont pris en compte pour le calcul du DAS-28

une réponse insuffisante pour les anti-TNF α mais présente des risques d'infections pulmonaires, urinaires et cutanées (Genovese, Becker et al. 2005).

3. Le récepteur de l'IL-6 est ciblé par le tocilizumab, le premier anticorps monoclonal humanisé IgG1 spécifique dirigé contre la sous-unité alpha du récepteur à l'IL-6 ou IL-6R (IL-6 CD126). En se liant à IL-6R le tocilizumab prévient la liaison du complexe IL-6/IL-6-R à une glycoprotéine transmembranaire (gp130) et inhibe la voie de signalisation de l'IL-6 en bloquant à la fois les récepteurs solubles et membranaires. Il est indiqué dans des cas de PR très sévères qui ne répondent pas à d'autres traitements de fond comme au MTX (Smolen, Avila et al. 2012).

IV.2.6.3 Evaluation de l'efficacité thérapeutique

Afin d'évaluer l'évolution de la pathologie, le clinicien dispose de plusieurs paramètres de quantification dont le score de l'activité de la maladie c'est à dire le nombre d'articulations atteintes sur 44 examinées (DAS-44) ou sur 28 (DAS-28) (voir Figure IV.4), l'index simplifié de l'activité de la maladie (SDAI) et l'index clinique de l'activité de la maladie (CDAI) (Haute Autorité de Santé, Guide médecin 2008). Parmi ces paramètres, les DAS sont les plus utilisés et associent la VS, l'appréciation globale de la maladie évaluée par le patient sur une échelle visuelle analogique de 0 à 100. Comme présenté dans la table IV-1, la PR est définie comme étant en rémission quand le DAS-44<1,6 ou le DAS-28<2,6. La réponse thérapeutique est évaluée en fonction de la variation du score de l'activité de

référence. Ainsi une thérapie qui diminue le DAS-28 de moins de 0,6 est considérée comme inefficace tandis qu'une diminution de plus de 1,2 est signe d'une bonne efficacité (Haute Autorité de Santé, Guide médecin 2008). Etant donné la complexité de ces scores multifactoriels, il est intéressant d'avoir des marqueurs biologiques prédictifs de l'activité de la maladie et permettant d'avoir une indication rapide de l'efficacité d'une thérapie.

Table IV-1: Définition de l'activité de la PR en fonction des scores DAS-28 et -44

Activité de la PR	Score DAS 28	Score DAS 44
Rémission	DAS 28 < 2,6	DAS < 1,6
Faible	$2,6 \leq \text{DAS } 28 \leq 3,2$	$1,6 \leq \text{DAS} \leq 2,4$
Modérée	$3,2 \leq \text{DAS } 28 \leq 5,1$	$2,4 \leq \text{DAS} \leq 3,7$
Forte	DAS 28 > 5,1	DAS > 3,7

IV.2.7 Modèles d'étude de la PR chez la souris

L'utilisation de modèles de PR chez les animaux a permis de déchiffrer beaucoup de processus inflammatoires et d'estimer leur importance dans la pathologie. Ils sont de plus en plus utilisés pour identifier et tester de nouvelles cibles thérapeutiques dans la PR. Ces modèles animaux partagent certains caractères généraux avec la pathologie humaine mais parfois d'autres spécifiques de l'animal (Bendele 2001). Il y a plusieurs modèles murins de PR dont l'arthrite induite soit par injection d'antigène, soit par injection d'anticorps arthrogéniques, soit par injection de collagène II, et des modèles transgéniques surexprimant le TNF α par exemple. De loin, le plus utilisé est le modèle d'induction de l'arthrite par injection de collagène II ou CIA (collagen-induced arthritis).

IV.2.7.1 Modèle CIA

Le modèle CIA consiste à injecter les souris avec du collagène de type II, qui est presque exclusivement présent dans le cartilage des articulations. Ainsi les souris développent des anticorps contre leur propre collagène II qui provoquent un gonflement des articulations voire une perte de leur fonction due à l'érosion osseuse. Le modèle CIA est particulièrement intéressant car il partage beaucoup de caractères immunologiques et pathologiques avec la PR humaine (Courtenay, Dallman et al. 1980). C'est la raison pour laquelle il est très utilisé pour tester l'efficacité des nouvelles thérapies. Cependant, le modèle CIA présente une variabilité élevée selon la souche de souris étudiée. En effet la réaction des souris dépend des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II mais aussi de l'espèce d'origine du collagène II utilisé (Wooley, Luthra et al. 1985). Les souches les plus sensibles sont les souris DBA/1 (H-2^q) qui répondent au collagène II bovin, porcin et humain, et les souris B10.RIII (H-2^f) qui répondent au collagène II porcin et bovin. Aucune de ces deux souches de souris

ne répond au collagène murin. Les souches C57BL/6 (H-2^b), 129/Sv (H-2^b) et Balb/c (H-2^d) sont résistantes au développement des signes d'arthrite avec le modèle CIA bien qu'elles puissent produire des anticorps arthrogéniques.

IV.2.7.2 Modèle CAIA

L'arthrite induite par injection d'anticorps anti-collagène II ou CAIA (collagen antibody-induced arthritis) est un modèle d'arthrite chez la souris qui peut servir d'alternative au CIA chez les souches C57BL/6 entre autres (Bendele 2001). Avec ce modèle les signes d'arthrite apparaissent entre 2 et 14 jours, alors qu'ils apparaissent en 3 mois dans le modèle CIA (Hegen, Keith et al. 2008). Ce modèle est très utile pour tester l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans le but d'un développement en clinique (Bendele, McComb et al. 1999).

IV.2.7.3 Evaluation de l'arthrite induite chez la souris

L'induction de l'arthrite peut être évaluée de façon quantitative avec le score clinique de l'arthrite qui peut s'appliquer aux modèles animaux. Il consiste à compter le nombre d'articulations gonflées au niveau des pattes et d'estimer leur fonctionnalité selon que la souris les utilise ou pas pour se déplacer. Les différents scores possibles pour une patte sont résumés dans la table IV-2. Un score global est calculé en faisant la somme des scores individuels des 4 pattes.

Table IV-2: Définition des différents scores cliniques d'une patte arthritique chez la souris

Score d'une patte	Caractéristiques
0	Aspect normal
1	Rougeur et gonflement d'une rangée d'articulations
2	Rougeur et gonflement modéré de 2 rangées d'articulations
3	Fort gonflement et rougeur de la patte entière
4	Patte fortement gonflée et non fonctionnelle

IV.2.8 Conclusion :

La fonction de l'endothélium est perturbée pendant la pathogénèse de la PR ainsi que le développement des comorbidités cardiovasculaires. Le dysfonctionnement endothélial pourrait être une cible très intéressante à étudier in vivo avec les modèles animaux de PR et chez les patients arthritiques. L'étude de l'état de l'endothélium dans la PR pourrait avoir des intérêts diagnostics, pronostics voire thérapeutiques.

IV.3 Syndrome d'hyperstimulation ovarienne :

Parmi les nombreuses pathologies impliquant des modifications de l'endothélium vasculaire, nous avons arrêté notre regard sur l'OHSS car les symptômes de cette pathologie sont observés dans notre élevage de souris femelles nullipares Y685F.

IV.3.1 Généralité sur l'OHSS

Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne ou OHSS (ovarian hyperstimulation syndrome) est une complication iatrogénique de la fertilisation *in vitro* et peut avoir de très graves conséquences pour la personne traitée. Il concerne environ 5% des femmes sous traitement hormonal pour induire la maturation ovarienne et le nombre d'ovocytes fécondables et l'incidence est en constante augmentation du fait d'une demande croissante pour la procréation médicalement assistée (Meldrum 2012). Ce syndrome est caractérisé par une augmentation bilatérale de la taille des ovaires, une irritation péritonéale avec de l'ascite et, dans certains cas, par une hémocoagulation, un déséquilibre électrolytique, une oligurie, un épanchement pleural ou péricardique et une hypercoagulabilité. Ces phénomènes sont la conséquence d'une forte augmentation de la perméabilité vasculaire entraînant l'accumulation de fluide dans les follicules ovariens et une forte pression abdominale (voir Figure IV.5). Les patientes sont suivies en milieu hospitalier (McClure, Leya et al. 1992, Balasch, Fábregues et al. 1998, Chen, Chen et al. 2012).

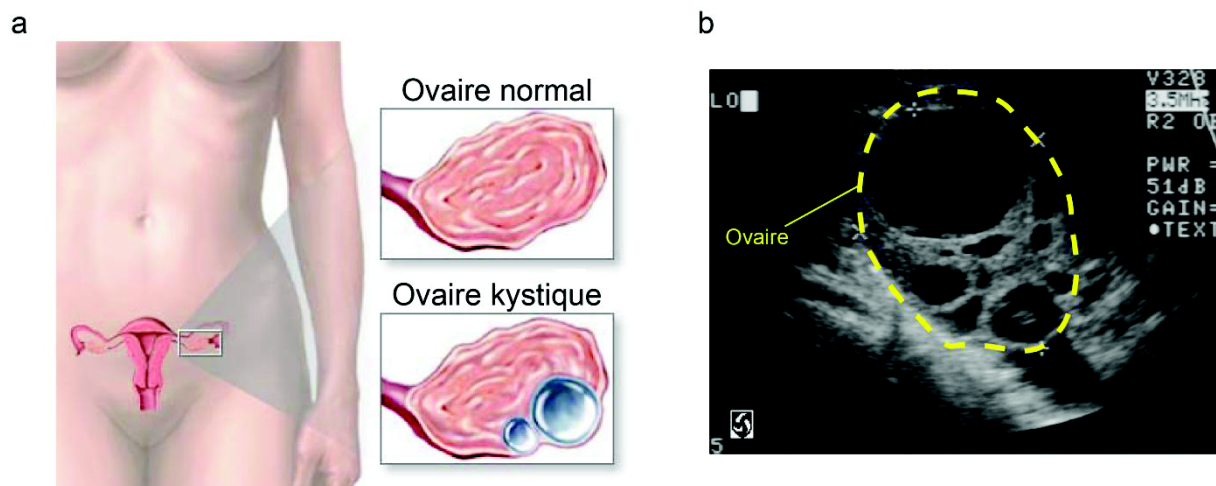


Figure IV.5: OHSS : (a) Représentation schématique d'un ovaire normal et d'un ovaire d'une patiente soumise à une hyperstimulation hormonale (image d'après <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus>); (b) échographie ovarienne d'une patiente présentant un syndrome d'OHSS

(d'après <http://brighamrad.harvard.edu/Cases/bwh/hcache/205/full.html>)

IV.3.2 Mécanismes

La physiopathologie du syndrome d'OHSS n'est pas encore totalement connue. Il existe une augmentation de la perméabilité capillaire, probablement provoquée par une hypersécrétion de VEGF au niveau ovarien responsable d'une activation de la production de prostaglandines et une activation du système rénine-angiotensine, résultant en un shift de fluides de l'espace intravasculaire dans la cavité péritonéale, pleurale et péricardique (McClure, Healy et al. 1994). Il a également été proposé que le système kalikreine-kinine soit impliqué dans l'hyperperméabilité vasculaire observée dans l'OHSS majoritairement par rapport à la voie VEGF/VEGFR-2 (Kobayashi, Okada et al. 1998). Mais depuis une large majorité des recherches menées sur le sujet ont conclu à une vraie implication du système VEGF/VEGFR-2 (Kasum 2010) car le blocage de l'activité de VEGFR-2 est suffisant pour empêcher l'induction de la perméabilité vasculaire induite par l'hyperstimulation hormonale (Gómez, Simón et al. 2002). Les fonctions couplées du VEGF et des hormones de la reproduction ont été rapportées pour avoir un effet déstabilisateur des protéines de jonctions adhérentes comme la VE-cadhérine (Villasante, Pacheco et al. 2007).

IV.4 Dysfonction endothéliale et autres pathologies

IV.4.1 Les ischémies

L'ischémie est une insuffisance de la circulation du sang dans un organe ou dans une partie du corps, le manque d'oxygène est en cause et perturbe, voire arrête la fonction de l'organe. Plusieurs causes peuvent être à l'origine d'une ischémie : une hémorragie, une diminution du débit sanguin, une plaque d'athérome, une thrombose, une compression d'une artère. Dans le cas d'infarctus du myocarde ou d'accident vasculaire cérébral, une forte augmentation de la perméabilité vasculaire dans l'heure qui suit l'évènement a été constatée (Lee, Zhai et al. 2007). L'œdème compromet le rétablissement de la fonction des tissus ischémiés (Weis 2008). Plusieurs mécanismes ont été rapportés comme participant à cette augmentation de la perméabilité vasculaire dont la voie majeure serait celle induite par la forte expression de VEGF en réponse à l'hypoxie. La phosphorylation du complexe VE-cadhérine/VEGFR-2 par les tyrosine kinases de la famille de Src semble jouer un rôle critique dans l'œdème (Weis, Shintani et al. 2004). En effet, les souris déficientes en Src ou Yes sont protégées de l'œdème subséquent à l'IM ou l'AVC (Paul, Zhang et al. 2001). Des approches pharmacologiques ont montré que l'utilisation d'antagonistes de VEGF de même que l'inhibition des kinases de la famille Src ont permis la même protection des souris (Weis, Shintani et al. 2004). Ainsi la dissociation des jonctions intercellulaires endothéliales constitue une cible intéressante pour diminuer les dommages causés aux tissus après un IM ou un AVC et permettre l'amélioration des fonctions de ces organes

IV.4.2 Les maladies inflammatoires à tropisme pulmonaire

Les corticoïdes, les immunosuppresseurs ou anti-inflammatoires (cyclophosphamide, méthotrexate) ont vu leurs indications s'élargir dans le traitement et la prévention d'un certain nombre de maladies auto-immunes. Les complications respiratoires, en dehors d'être les plus fréquentes, sont également les principales causes de morbidité et de mortalité dans la population des malades soumis à une immunosuppression thérapeutique. Elles peuvent être classées en 3 groupes selon leur origine : les complications infectieuses, tumorales et iatrogènes liées à l'utilisation de l'immunosuppresseur, les complications spécifiques de la maladie sous-jacente, et celles enfin aspécifiques c'est-à-dire embolie pulmonaire, œdème pulmonaire hémodynamique et hémorragie pulmonaire. Elles peuvent toucher tous les tissus c'est-à-dire la plèvre, les voies aériennes, les vaisseaux pulmonaires mais s'expriment le plus souvent sous la forme d'une pneumopathie. Plusieurs études ont montré que la perméabilité vasculaire induite par l'assistance respiratoire est due à une réponse active des cellules endothéliales, aux contraintes mécaniques, qui activent des voies de signalisation entraînant la perméabilité. Ces voies de signalisation semblent impliquer les kinases de la famille Src car leurs inhibiteurs réduisent l'œdème, induit par la ventilation pulmonaire chez les souris, en préservant l'expression de la β -caténine (Gillrie, Krishnegowda et al. 2007, Miyahara, Hamanaka et al. 2007).

IV.4.3 Pathologies oculaires

Depuis le début du XXI^e siècle, des traitements médicaux efficaces ont commencé à être utilisés pour traiter certaines maladies de la rétine et notamment de la macula. Ils prennent place aux côtés du laser et de la chirurgie. Certains de ces traitements en sont encore au stade de l'essai clinique, c'est-à-dire au stade d'évaluation de leur efficacité. La rétinopathie diabétique tout comme la dégénération maculaire liée à l'âge (DMLA) s'accompagnent d'œdème rétinien dû à une dysfonction de la barrière endothéliale par une activation de la voie VEGF/VEGFR2 qui est à l'origine de la perméabilité vasculaire et qui conduit à l'œdème. Plusieurs données précliniques montrent des résultats encourageants concernant l'utilisation d'un aptamère (petit ARN de 28 bases) ou d'anticorps anti-VEGF qui inhibent sa fonction dans le DMLA (Vinores 2006, Lowe, Araujo et al. 2007). Par ailleurs, au plan cellulaire, le clivage de la VE-cadhérine dans la rétinopathie diabétique a été montré dans plusieurs études suggérant son utilisation potentielle en tant que biomarqueur de l'atteinte oculaire (Harhaj and Antonetti 2004, Navaratna, McGuire et al. 2007).

IV.5 Conclusion

Parmi les pathologies décrites dans le chapitre ci-dessus, il apparaît que l'endothélium vasculaire subit de nombreuses modifications physiopathologiques qui peuvent avoir une importance majeure dans le

remodelage vasculaire. Ces différents changements de la physiologie de l'endothélium et de ses jonctions intercellulaires pourraient être à l'origine de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ou d'outils cliniques pour évaluer la sévérité de ces maladies ou encore l'efficacité d'un médicament pour une meilleure prise en charge des patients.

.

**Partie II: Contribution de la
thèse aux modifications de la
VE-cadhérine et leurs intérêts *in
vitro* et *in vivo***

Chapitre I: Phosphorylation et clivage de la VE-cadhérine sous l'action du $\text{TNF}\alpha$: implications dans la polyarthrite rhumatoïde

I.1 Contexte scientifique

Nous avons vu dans le chapitre précédent, que la PR est une pathologie autoimmune caractérisée par des processus inflammatoires et angiogéniques aux articulations atteintes mais qui peut aussi s'accompagner de troubles cardiovasculaires qui sont le reflet d'une agression endothéliale dont les mécanismes moléculaires restent à être déterminés. Les jonctions intercellulaires endothéliales qui assurent l'intégrité de l'endothélium vasculaire sont la cible des nombreuses cytokines inflammatoires libérées dans cette pathologie. En effet, la stabilité des jonctions adhérentes dépend d'un équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation des protéines composant ces structures y compris la VE-cadhérine, protéine majeure des jonctions adhérentes. Lorsque les processus de phosphorylation sont majoritaires, les jonctions sont plus instables et ces modifications covalentes des protéines sont considérées comme étant favorables à une augmentation de la perméabilité endothéliale, une migration endothéliale et une angiogénèse active. La participation des cytokines inflammatoires dans des processus de clivage des domaines adhésifs extracellulaires des cadhérines a été décrites y compris pour le $\text{TNF}\alpha$ qui régule l'expression de certaines protéases comme les MMPs (Rotundo, Curtis et al. 2002). Ces protéases sont très importantes pour le remodelage de la matrice extracellulaire au cours des processus de cicatrisation cellulaire, d'angiogénèse et de processus métastatiques. Sous l'effet d'agents inflammatoires (thrombine, histamine, PAF) et de facteurs de croissance (VEGF), la VE-cadhérine est la cible à la fois de tyrosine kinases dans son domaine cytoplasmique et de protéases dans son domaine extracellulaire, qui lui confèrent des modifications structurales qui fragilisent sa fonction adhésive nécessaire à la bonne cohésion des cellules endothéliales. Pour un même effecteur cellulaire, l'existence d'un lien entre ces deux modifications n'a pas encore été rapportée. Le $\text{TNF}\alpha$, cytokine pro-inflammatoire majeure dans la PR, est un puissant inducteur de la perméabilité endothéliale in vitro et in vivo, connu également pour stimuler la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine. Cependant, aucune donnée de la littérature ne permet d'établir son action potentielle sur le clivage du domaine extracellulaire de la protéine ni un lien entre les deux modifications enzymatiques.

I.2 Objectifs des travaux de recherche

Au laboratoire, nous avons précédemment étudié la phosphorylation de la VE-cadhérine sous l'action du PAF et du VEGF *in vitro* en se focalisant sur les kinases impliquées et les sites phosphorylés. Dans cette étude, il nous est donc apparu très intéressant de déterminer l'effet du TNF α sur la VE-cadhérine compte-tenu de l'impact de cette cytokine dans la PR et des désordres vasculaires associés, avec un regard plus précis sur l'existence potentielle d'un clivage de la VE-cadhérine *in vitro* et un lien avec à la phosphorylation sur tyrosine de la molécule. De plus, l'intérêt de trouver un marqueur du dysfonctionnement endothélial chez les patients arthritiques dans les phases précoces du diagnostic ou au cours de son évolution, est majeur pour permettre une meilleure prise en charge des patients.

Les effets du TNF ont été étudiés sur monocouche de cellules endothéliales (HUVECs) avec analyse des milieux de culture pour la présence de VE-cadherine soluble et celle des lysats cellulaires pour l'analyse de VE-cadherine cytoplasmique. Ces expériences avaient pour objectifs :

- d'étudier l'effet du TNF α sur le clivage du fragment extracellulaire de la VE-cadhérine
- de déterminer l'implication du processus de phosphorylation sur tyrosine et particulièrement l'activité des kinases de la famille Src
- d'identifier les protéases susceptibles de participer à la protéolyse de la VE-cadhérine
- d'analyser des sérums de patients arthritiques pour détecter la présence de formes solubles de la VE-cadhérine et d'étudier leur lien avec les données cliniques.

Ces expériences ont abouti à des résultats particulièrement intéressants tant sur le mécanisme de clivage du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine que sur l'intérêt potentiel du fragment soluble libéré suite à cette protéolyse en application clinique. Ces données ont fait l'objet d'une publication scientifique en 2012 dans la revue « Arthritis and Rheumatism ». Les principaux résultats de cette publication sont présentés ci-après.

I.3 Principaux résultats

La stimulation des cellules endothéliales par le TNF α induit un relargage du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine d'un poids moléculaire apparent de 90 kDa correspondant au domaine entier. Aucun autre fragment n'a été détecté. Le processus est rapide et l'étude cinétique montre un phénomène croissant jusqu'à 60 min et déjà détectable dès 10 min de stimulation. La réaction est dose-dépendante et mesurable avec des concentrations faibles de 0,5 ng/mL de TNF α .

La rapidité de libération de VE-cadhérine soluble nous a conduit à supposer l'implication de processus de signalisations intracellulaires déclenchés rapidement après l'ajout du TNF α , et en particulier les processus de phosphorylation. L'utilisation de Genistein, inhibiteur pharmacologique à large spectre de tyrosine kinases bloque le clivage de la VE-cadhérine induit par le TNF α alors que l'inhibition

d'activités tyrosine phosphatases le favorise. Le blocage de l'activité Src kinase par l'utilisation d'inhibiteur pharmacologique PP2, ou par siRNA montre l'abrogation du clivage induit par TNF α . De façon concomitante, le domaine cytoplasmique clivé de la VE-cadhérine peut être détecté dans les lysats cellulaires. Ces résultats sont en faveur de l'implication de tyrosine kinases dont Src dans l'action du TNF α sur le clivage de la VE-cadhérine. Etant donné l'implication de cette même kinase dans l'augmentation de la perméabilité endothéliale, ces résultats suggèrent un lien moléculaire entre les processus de phosphorylation et de clivage de la VE-cadhérine.

L'analyse des protéases impliquées dans le clivage de la VE-cadhérine induit par le TNF α a été réalisée par zymographie sur les milieux de culture des cellules après stimulation et par utilisation d'activateurs (PMA) et d'inhibiteurs pharmacologiques (GM 6001). L'activation des MMPs entraîne la production, dans le milieu et l'extrait cellulaire, des fragments de VE-cadhérine soluble (90 kDa) et cytoplasmique (35 kDa) de mêmes tailles que sous l'effet du TNF α indiquant la participation de ces protéases dans ce contexte précis. L'inhibition des métalloprotéases par le GM 6001 bloque ce processus, démontrant l'implication des MMPs en réponse à TNF α . L'analyse de l'expression et l'état d'activation de MMP-2, MMP-9 et ADAM-10 a montré que seule l'expression et l'activation de MMP-2 sont corrélées avec le niveau de VE-cadhérine soluble suggérant fortement son implication dans le clivage de la VE-cadhérine.

Le TNF α ayant un rôle majeur dans la PR, nous avons examiné si de la VE-cadhérine soluble était détectable dans des sérums de patients atteints de PR débutante par la technique de western blot. L'analyse de différentes dilutions de sérum a permis de détecter une seule bande immunoréactive de 90 kDa correspondant à la forme de VE-cadhérine observée dans les milieux de culture de cellules endothéliales traitées par TNF α . Une cohorte de 63 patients polyarthritiques issus du protocole VeRA (very early rheumatoid arthritis) initié par l'équipe de rhumatologues de Rouen a été analysée. L'objectif de cette étude était d'identifier un ou des marqueur(s) du tissu synovial susceptible(s) de prédire la progression de l'atteinte érosive dans un échantillon de malades atteints d'une PR débutante. La quantification de VE-cadhérine soluble réalisée chez les patients avant traitement a été mise en regard d'autres paramètres biologiques mesurés ainsi que l'activité de la maladie, le DAS-44. De façon très intéressante, il est apparu que le paramètre VE-cadhérine soluble corrèle de façon indépendante des autres paramètres biologiques avec l'activité de la maladie. Ces résultats nous ont amenés à proposer le dosage de la VE-cadhérine soluble comme un marqueur potentiel de l'activité de la maladie au moins chez les patients ayant une PR débutante et surtout pour ceux qui ne présentent pas de CRP élevée. Des études supplémentaires sont en cours pour examiner l'utilité du dosage de la VE-cadhérine soluble pour déterminer plus particulièrement la réponse ou non à une thérapie donnée, et en particulier les biothérapies.

Au total, ces premiers résultats montrent qu'une cytokine proinflammatoire aussi importante que le TNF α a un impact sur une protéine exclusivement exprimée dans l'endothélium vasculaire, la VE-cadhérine, en induisant le clivage de son domaine adhésif extracellulaire, dont le taux circulant chez

des patients PR est corrélé au score de la maladie. Le développement à grande échelle de ce dosage devra être conforté pour élargir ses champs d'applications. Il n'en demeure pas moins que les évidences à l'échelle moléculaire des modifications structurales de la VE-cadhérine en réponse à $\text{TNF}\alpha$ en font un candidat biomarqueur dans la PR tout à fait recevable.

I.4 Article 1: Soluble VE-Cadherin in Rheumatoid Arthritis Patients Correlates With Disease Activity

“Cet article est paru dans Arthritis and Rheumatism (2012), 64:1, 77-87 ; les données font l’objet d’une demande de brevetabilité aux Etats Unis par INSERM-TRANSFERT avec le numéro de dossier BIO 12197 : A method for treating rheumatoid arthritis ”

Soluble VE-Cadherin in Rheumatoid Arthritis Patients Correlates With Disease Activity

Evidence for Tumor Necrosis Factor α -Induced VE-Cadherin Cleavage

Adama Sidibé,¹ Tiphaine Mannic,¹ Mélanie Arboleas,¹ Mariela Subileau,¹
Danielle Gulino-Debrac,¹ Laurence Bouillet,² Mary Jan,³ Thibault Vandhuick,³
Xavier Le Loët,³ Olivier Vittecoq,³ and Isabelle Vilgrain¹

Objective. Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, systemic inflammatory disorder that principally attacks synovial joints. However, accelerated atherosclerosis and increased cardiovascular morbidity and mortality are major clinical consequences of endothelial dysfunction in RA patients. Tumor necrosis factor α (TNF α) is the major mediator of inflammation in RA, related to vascular injury by targeting VE-cadherin, an endothelium-specific adhesion molecule of vital importance for endothelium integrity and angiogenesis. We undertook this study to examine the mechanisms regulating VE-cadherin processing by TNF α and their occurrence in RA.

Methods. Human umbilical vein endothelial cells were used in primary culture and treated with recombinant TNF α to study VE-cadherin cleavage. Cell lysates and conditioned media were analyzed by Western blotting for VE-cadherin cytoplasmic domain and extra-cellular domain (VE-90) generation, respectively. VE-90 was analyzed at baseline and at the 1-year followup in

sera from 63 RA patients (from the Very Early Rheumatoid Arthritis cohort) with disease duration of <6 months.

Results. TNF α induced a time-dependent shedding of VE-90 in cell media. This effect was prevented by tyrosine kinase inhibitors (genistein and PP2) or by knocking down Src kinase. In contrast, tyrosine phosphatase blockade enhanced VE-cadherin cleavage, confirming the requirement of tyrosine phosphorylation processes. In addition, using the matrix metalloproteinase (MMP) activator APMA and the MMP inhibitor GM6001, we demonstrated that MMPs are involved in TNF α -induced VE-cadherin cleavage. Of major importance, VE-90 was detected in sera from the 63 RA patients and was positively correlated with the Disease Activity Score at baseline and after 1-year followup.

Conclusion. These findings provide the first evidence of VE-cadherin proteolysis upon TNF α stimulation and suggest potential clinical relevance of soluble VE-cadherin in management of RA.

Supported by INSERM, the French National Cancer Institute, and the CEA. Mr. Sidibé and Dr. Mannic's work was supported by grants from the Courtin Arthritis Foundation.

¹Adama Sidibé, MSc, Tiphaine Mannic, PhD (current address: Geneva University Hospital, Geneva, Switzerland), Mélanie Arboleas, BSc, Mariela Subileau, MSc, Danielle Gulino-Debrac, PhD, Isabelle Vilgrain, Pharm, PhD: INSERM Unité 1036, Joseph Fourier University-Grenoble 1, and CEA Grenoble, Grenoble, France; ²Laurence Bouillet, MD, PhD: INSERM Unité 1036, Joseph Fourier University-Grenoble 1, CEA Grenoble, and Grenoble University Hospital, Grenoble, France; ³Mary Jan, PhD, Thibault Vandhuick, MD, Xavier Le Loët, MD, Olivier Vittecoq, MD, PhD: Rouen University Hospital, INSERM Unité 905, Rouen, France.

Address correspondence to Isabelle Vilgrain, Pharm, PhD, INSERM Unité 1036, Institute of Life Sciences Research and Technologies, Joseph Fourier University, CEA Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France. E-mail: ivilgrain@cea.fr.

Submitted for publication December 23, 2010; accepted in revised form September 1, 2011.

Rheumatoid arthritis (RA) is the most prevalent inflammatory joint disease, affecting 0.3% of the French population (1,2). It is characterized by a persistent synovial inflammation, leading eventually to cartilage and bone destruction. Indeed, the synovium in RA becomes inflamed and increases greatly in mass, because of hyperplasia of the lining cells. The synovial pannus invades the cartilage and the subchondral bone. This hyperplasia of synovial tissue is associated with increased angiogenesis to oxygenate the synovium (3).

RA is also associated with both traditional and nontraditional cardiovascular risk factors. Age and hypertension were found to correlate with this increased cardiovascular risk, but factors associated with inflammation also contributed, including neutrophil count, radiographic score, and uric acid levels. The observed inflammation of blood vessels is essentially the consequence of the release of both soluble and cell-bound mediators including numerous growth factors, pro-inflammatory

matory cytokines and chemokines, components of the synovial matrix, matrix-degrading proteinases, and cellular adhesion molecules (4). Most of these mediators are released by macrophages and vascular endothelial cells (ECs) into the RA synovium. Among them, tumor necrosis factor α (TNF α) is a key factor which is highly expressed in RA and has been considered to be one of the most important cytokines in the pathogenesis of the disease (5). Although TNF α provokes the biosynthesis and release of multiple endogenous mediators that can directly/indirectly contribute to the EC response, it directly influences endothelial barrier function in vitro (6).

Normal endothelial barrier integrity is maintained by organized tight and adherens junctions that restrict the lateral diffusion of membrane lipids and proteins and the paracellular exchange of solutes (7). Alterations in adherens junction assembly influence EC motility, vascular morphogenesis, and permeability (8). The major cell-cell adhesion molecule at endothelial adherens junctions is VE-cadherin, a cadherin family member specifically expressed in ECs. VE-cadherin consists of 1 extracellular fragment exhibiting 5 domains responsible for multimeric interactions in the presence of calcium, 1 short transmembrane domain, and a cytoplasmic domain which in turn interacts with catenins to strengthen cell-cell adhesion (6,9). Numerous endogenous mediators of inflammation including histamine, thrombin, TNF α , platelet-activating factor, and activated leukocytes have been shown to increase microvascular permeability by targeting VE-cadherin (8,10–13). Among the molecular mechanisms regulating VE-cadherin adhesive properties, tyrosine phosphorylation processes have been largely documented in inflammation and angiogenesis upon challenge with cytokines and growth factors (9). The cleavage of VE-cadherin extracellular domain by proteinases such as serine proteinases (including elastase, cathepsin G, and proteinase

3), matrix metalloproteinases (MMPs; such as MMPs 2, 8, and 9), and the metalloproteinase ADAM-10 is another molecular mechanism involved in neutrophil progression across the endothelial junctions during inflammatory processes (14–17).

Early studies have used in vitro ECs to demonstrate the role of TNF α in causing EC monolayer disruption leading to permeability mediated by VE-cadherin (8,10,13). We designed the present study to determine whether TNF α could induce structural modifications of VE-cadherin that could account for decreased adhesive properties of the protein and increased permeability. We examined whether TNF α could induce VE-cadherin cleavage and whether tyrosine kinases and metalloproteinases

were involved in this process. Importantly, we addressed for the first time the question of the clinical relevance of soluble VE-cadherin (VE-90) in RA patients.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Recombinant human TNF α was obtained from Invitrogen. The tyrosine kinase inhibitor genistein (Molekula) and the Src family kinase inhibitor PP2 (Calbiochem) were used in this study. Sodium orthovanadate, H₂O₂, the MMP inhibitor GM6001, and the MMP activator APMA were purchased from Sigma-Aldrich. Commercially available antibodies were purchased from different sources. Goat polyclonal anti-VE-cadherin cytoplasmic domain (C19) and mouse monoclonal anti-VE-cadherin extracellular fragment (clone BV9) were from Santa Cruz Biotechnology. Mouse monoclonal antiphosphotyrosine (clone 4G10) was from Millipore. Mouse polyclonal anti- β -actin was from Sigma-Aldrich. Rabbit polyclonal anti-c-Src was from Invitrogen. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated purified rabbit anti-mouse IgG was from Bio-Rad. Rabbit polyclonal anti-MMP-2 precursor was from Eptomics.

Enhanced chemiluminescence detection reagents were purchased from PerkinElmer. Nitrocellulose was obtained from Schleicher & Schuell. The micro-bicinchoninic acid (micro-BCA) protein assay reagent kit was from Fisher Scientific.

Buffers. Buffer A was 20 mM Tris HCl (pH 7.0), 0.27M sucrose, 1% (volume/volume) Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamidine, 4 fLg/ml leupeptin, and 1 fLg/ml pepstatin A. Buffer B was 10 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (v/v) Nonidet P40, and 0.1% bovine serum albumin.

To make sodium pervanadate (Na₃VO₄) solution, a stock solution of pervanadate at 50 mM was prepared by mixing equal volumes of 0.1M sodium orthovanadate and 0.2M H₂O₂. After incubation at room temperature for 20 minutes, the solution was diluted in phosphate buffered saline to a final concentration of 5 mM before use. The final concentration used for cell treatment was 5 fLM.

Cell culture, extraction, and immunoprecipitation. Human umbilical vein ECs (HUVECs) were grown to confluence in M199 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 2% low serum growth supplement (Cascade Biologics) as previously described (18). The 80% confluent HUVECs (passages 2 or 4) were used for most experiments. Confluent cells in 60-mm dishes were serum-starved in 1% FCS in M199 for 24 hours prior to testing. Before TNF α stimulation, the cells were serum-starved for 2 hours and then pre-treated for 15 minutes with sodium pervanadate (10 μ M) and/or inhibitors. HUVECs were then stimulated with different concentrations of TNF α for various lengths of time, as indicated. Otherwise, in most parts of this study, especially the inhibition experiments, TNF α was used at high concentration (i.e., 100 ng/ml). Since the inhibitors were diluted in DMSO, control cells were systematically treated with 0.1% DMSO in any inhibition experiment. The use of DMSO did not have any effect on the phosphorylation and proteolysis processes of VE-cadherin.

Cell stimulation was stopped by medium collection and addition of 500 fLl of ice-cold buffer A. The cells were harvested, homogenized, and sonicated for 20 seconds. Cell lysates were

collected after centrifugation at 14,000g for 15 minutes at 40°C. The protein concentration was measured using the micro-BCA protein assay, and cell lysates were stored at -80°C before use.

For conditioned medium analysis, the medium was collected and centrifuged at 14,000g for 15 minutes at 4°C. The resulting supernatant was collected, and proteins were concentrated by overnight precipitation with 10% trichloroacetic acid. After centrifugation at 14,000g for 30 minutes, the pellet was resuspended in 50 mM Tris (pH 11.0) and analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting.

For immunoprecipitation, 500 fLg of protein of different cell extracts was incubated with 2 fLg of the mono-clonal antibody to VE-cadherin in 500 fLl of buffer B for 1 hour at 4°C. Immunoprecipitations were performed with protein G-Sepharose beads, and fractions were collected for 45 minutes at 4°C. The fractions were centrifuged for 5 minutes at 4°C, and the immunoprecipitates were washed 5 times with buffer B. Samples were eluted by boiling in Laemmli buffer containing a final concentration of 2.5% (v/v) (3-mercaptoethanol, and subjected to SDS-PAGE (12% acrylamide, 0.2% bis-acrylamide).

Src small interfering RNA (siRNA) transfection in HUVECs. A pool of 4 target-specific siRNA designed to target

c-Src (sc-29228) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, and the appropriate control siRNA (45-2001) was purchased from Invitrogen. The transfection protocol used HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen). HUVECs were grown in 60-mm dishes in M199 with 10% FCS to reach 80% confluence. Before transfection, culture medium was replaced by M199 only for 3 hours. The c-Src and control siRNA (30 nm each) were preincubated with 20 μ l HiPerFect Transfection Reagent for 10 minutes according to the manufacturer's instructions, and the transfection mixture was added to the cells (20 fLl/ml) for 3 hours in the absence of serum. The cells were used 48 hours after transfection.

Western blotting. Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. The blots were saturated with nonfat milk, incubated with the specific primary antibody followed by the specific HRP-conjugated secondary antibody, and revealed by chemiluminescence (further details are available at <http://www-dsv.cea.fr/irtsv/bci/jea/arthritis-supplement>).

Statistical analysis. All of the experiments were repeated at least 3 times. Values represent the mean \pm SD of 3 determinations from 3 different wells or dishes in the same experiment. Each experiment was performed at least 3 times under identical or similar conditions with comparable results.

RA patients. Our analysis was based on 63 patients from the Very Early Rheumatoid Arthritis cohort (19,20) who

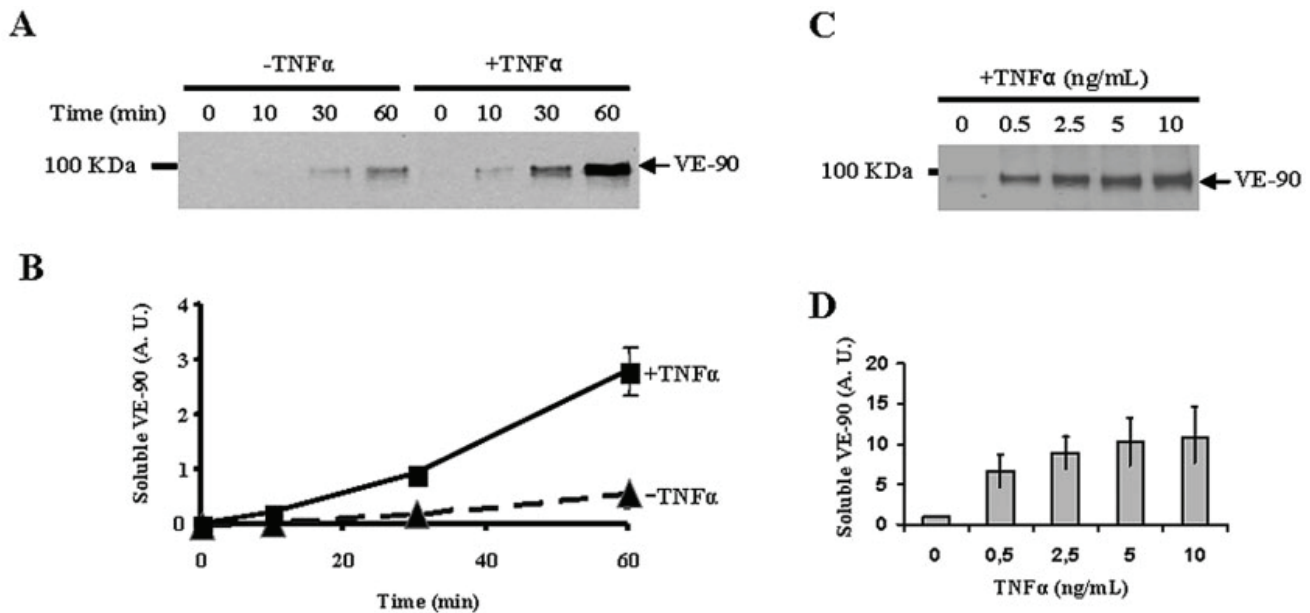


Figure 1. Kinetic and dose-response experiments of VE-cadherin extracellular fragment cleavage upon challenge with tumor necrosis factor α (TNF α). **A**, Kinetic experiment with either phosphate buffered saline (-TNF α) or TNF α (+TNF α) (100 ng/ml) for 0–60 minutes. Conditioned media were collected and analyzed for VE-cadherin content as described in Materials and Methods. TNF α induced a time-dependent release of the 90-kd fragment of VE-cadherin (VE-90). **B**, Relative amounts of VE-cadherin extracellular fragment in **A**, as measured by densitometry of autoradiographs using National Institutes of Health ImageJ software. **C**, Dose-response experiment with increasing physiologic concentrations of TNF α (0–10 ng/ml) for 45 minutes. The analysis of conditioned media was performed as described in Materials and Methods. **D**, Quantification of the dose-response experiment in **C**. Values in **B** and **D** are the mean \pm SD. Results are representative of 3 experiments. AU = arbitrary units

had peripheral disease manifestations characterized by the swelling of >2 joints (lasting >4 weeks and evolving for <6 months) and who had not received any systemic disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) or glucocorticoids. The patients were recruited prospectively in the Rheumatology Department of the Rouen University Hospital and had a standardized followup. Patients' clinical, biologic, and radiographic parameters were recorded at inclusion and every 6 months thereafter. Only data recorded at inclusion are reported herein. The clinical parameters recorded were demographic information (age and sex), disease duration (defined as the length of time since the date at which the first symptoms appeared), joint pain intensity evaluated using a 0–100-mm visual analog scale, and the numbers of painful and swollen joints among the 44 joints examined. The following biologic parameters were recorded: erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP) level, rheumatoid factor (RF) level detected by agglutination (latex fixation test and Rose-Waaler test), and anti-cyclic citrullinated peptide 2 (anti-CCP-2) level detected with a commercially available kit (Euroimmun). The modified Sharp/van der Heijde score was the radiographic parameter used to analyze radiographic features of the joints. For the first 2 years, treating rheumatologists were given recommendations so that the included patients would be treated homogeneously. The guidelines had been devised before early intensive DMARD administration had become the internationally accepted strategy and before the availability of biotransformation in France. Schematically, it was recommended not to use systemic glucocorticoids unless necessitated by very active disease, and then only briefly at the lowest possible dose. For DMARDs, it was recommended to start with hydroxychloroquine (6 mg/kg/day), to be replaced or combined with oral methotrexate, starting at 7.5 mg/week.

Statistical analysis for RA cohort. In addition to a descriptive analysis of the studied population, we used the Spearman correlation coefficient to evaluate the relationship between the titers of soluble serum VE-cadherin and clinical or biologic parameters recorded at baseline prior to initiation of DMARDs and/or corticosteroids and during the first year of followup. All Western blot bands have been subjected to densitometry; data are expressed in arbitrary units as the mean \pm SD of at least 3 identical experiments and were compared using Student's *t*-test. For all tests, *P* values less than or equal to 0.05 were considered significant.

RESULTS

TNF α induces posttranslational processing of 125-kd VE-cadherin and generates its 90-kd extracellular domain. Early in vitro and in vivo studies have demonstrated the role of TNF α in causing EC monolayer disruption leading to increased permeability. Because VE-cadherin extracellular domain is responsible for the strong endothelial cell–cell adhesion, we examined whether it was rapidly processed upon TNF α challenge. HUVECs were treated or not for 5–60 minutes with TNF α at 100 ng/ml, a concentration reported to induce a rapid VE-cadherin tyrosine phosphorylation and an increased EC permeability (13). The respective

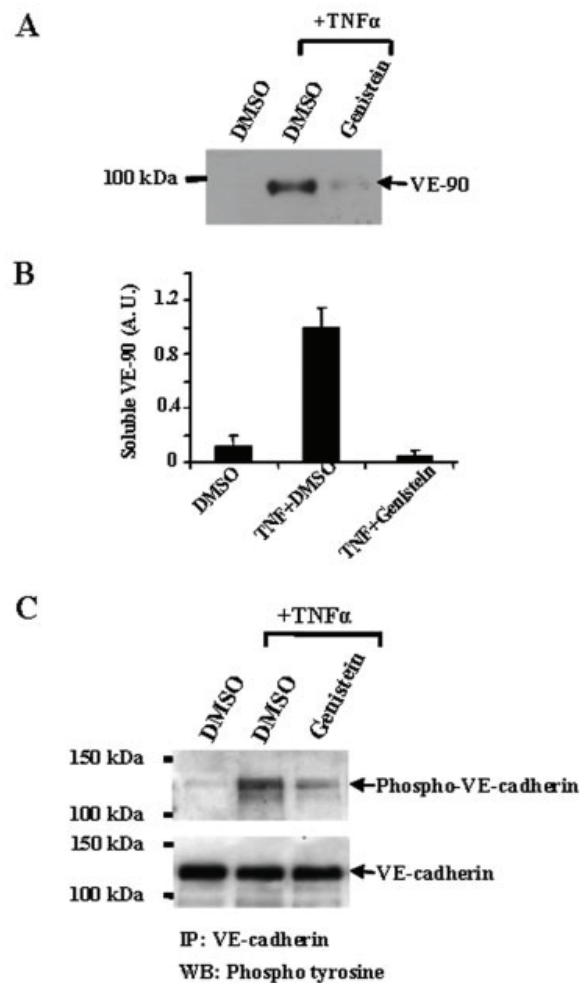


Figure 2. Implication of tyrosine kinase activities in TNF α -induced VE-cadherin cleavage. Human umbilical vein endothelial cells pretreated with 0.1% DMSO or genistein (50 μ M) for 15 minutes were then treated or not treated with TNF α (100 ng/ml) for 45 minutes as indicated. Conditioned media were collected and analyzed for VE-cadherin content as described in Materials and Methods. **A** and **B**, Relative amounts of extracellular VE-cadherin (**A**) were measured by densitometry of autoradiographs using National Institutes of Health ImageJ software (**B**). Values in **B** are the mean \pm SD. **C**, TNF α -treated cell lysates were prepared as described in Materials and Methods, and 200 μ g of protein was immunoprecipitated (IP) with antibody specific to VE-cadherin C-terminus domain. The immunoprecipitates were analyzed by Western blotting (WB) with antibody to phosphotyrosine (top). The membrane was then stripped and reprobed with antibody specific to VE-cadherin (bottom). **Arrows** indicate the position of the immunoprecipitated tyrosine phosphorylated form of VE-cadherin (top) and total VE-cadherin (bottom) at 125 kD. Results are representative of at least 3 independent experiments. See Figure 1 for other definitions.

conditioned media were analyzed by Western blot with monoclonal antibody to VE-cadherin.

Figure 1A shows the presence of 1 immunoreactive band with an apparent molecular weight of 90 kD.

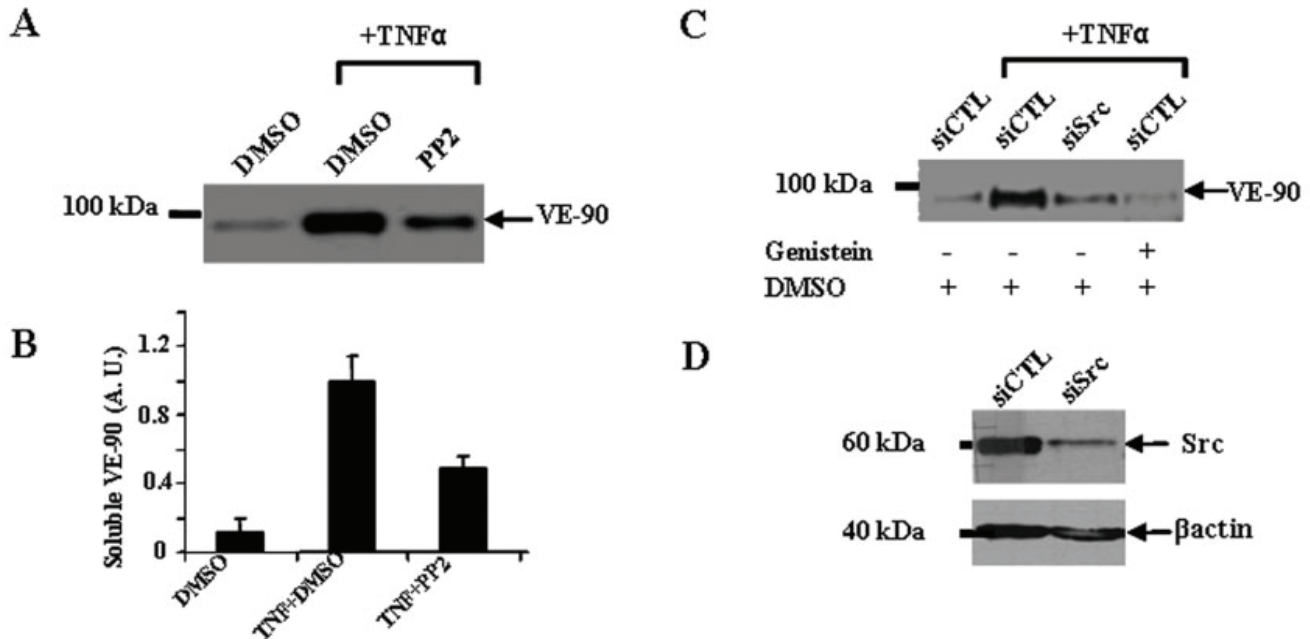


Figure 3. Involvement of Src family kinase(s) in VE-cadherin cleavage upon TNF α stimulation. **A**, Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) pretreated with DMSO vehicle (0.1%) or PP2 (10 μ M) were treated or not with TNF α (100 ng/ml) for 45 minutes as indicated. The conditioned media were collected and analyzed by Western blotting with VE-cadherin extracellular fragment-specific antibody. **B**, The relative amounts of extracellular VE-cadherin were measured by densitometry of autoradiographs using National Institutes of Health ImageJ software. Values are the mean \pm SD. Results are representative of 3 independent experiments. **C**, HUVECs at 80% confluence were transfected with c-Src-targeted small interfering RNA (siSrc) or control small interfering RNA (siCTL). After 48 hours, cells were pretreated with the γ -secretase inhibitor L685,458 (10 μ M) for 15 minutes and then treated or not for 45 minutes with TNF α in the presence or absence of genistein as indicated. The treated cells media were analyzed with specific antibody to detect VE-cadherin extracellular cleaved fragment. **D**, Immunoblotting with c-Src-specific antibody on cell extracts 48 hours after transfection showed an efficient knockdown of Src kinase. Results are representative of 3 independent experiments. See Figure 1 for other definitions.

Based on its size and immunoreactivity, it corresponded to the full length of the extracellular domain of VE-cadherin (VE-90) (21). The VE-90 was rapidly detected after 10 minutes of TNF α stimulation and increased in a time-dependent manner up to 60 minutes, while it was barely detectable in untreated cells. Quantification of the immunoreactive bands using National Institutes of Health ImageJ software is illustrated in Figure 1B. This result demonstrates that TNF α is a potent inducer of VE-cadherin extracellular domain cleavage. A dose-response curve was then performed using pathophysiologically relevant concentrations of TNF α . Figure 1C shows a strong effect of TNF α detected early at a low concentration of 0.5 ng/ml, which increased in a dose-dependent manner to reach a plateau between 5 and 10 ng/ml (Figure 1D). Altogether, these results demonstrate that TNF α is a powerful inducer of VE-cadherin extracellular domain cleavage at concentrations that correlate with pathophysiologic conditions.

Tyrosine kinases are required for TNF α -induced VE-cadherin cleavage. Adherens junction assembly is known to be regulated in part through tyrosine phosphorylation of proteins within the multiprotein complex,

including α -catenin, β -catenin, p120-catenin, and VE-cadherin (8,22–24). In order to examine whether tyrosine kinases were involved in the observed TNF α -induced VE-cadherin cleavage, the same experiment as described above was performed using genistein (50 μ M), a broad-spectrum tyrosine kinase inhibitor, prior to TNF α challenge. Analysis of VE-90 in the conditioned media showed that genistein strongly decreased TNF α -induced VE-cadherin extracellular domain cleavage (Figures 2A and B). In addition, genistein inhibited TNF α -induced VE-cadherin tyrosine phosphorylation (Figure 2C) without affecting cell viability (further details are available at <http://www-dsv.cea.fr/irtsv/bci/jea/arthritis-supplement>). These data demonstrate that tyrosine kinases are required for TNF α -induced VE-cadherin cleavage.

TNF α -induced VE-cadherin cleavage is dependent upon Src kinase activity. Given the large body of evidence supporting a major role of Src kinase in disassembly of adherens junctions in ECs and VE-cadherin phosphorylation, the role of Src family kinases

in TNF α -induced VE-cadherin cleavage was further determined. To this end, HUVECs were pretreated with the Src family kinase inhibitor PP2 prior to TNF α stimulation. As shown in Figures 3A and B, the strong TNF α -induced VE-90 release observed after 45 minutes was strongly decreased by PP2 treatment without affecting cell viability (further details are available at <http://www-dsv.cea.fr/irtsv/bci/jea/arthritis-supplement>). In addition, the knockdown of Src using Src-specific siRNA efficiently impaired TNF α -induced VE-90 release in cell medium, while control siRNA had no effect (Figures 3C and D). This experiment strongly confirmed the specific requirement of Src kinase activity for TNF α -induced VE-90 release.

VE-90 release is associated with the generation of VE-cadherin cytoplasmic domain. We further examined whether the cleavage of VE-cadherin extracellular domain induced by TNF α was concomitantly associated with the generation of its cytoplasmic domain (VE-cyto). This process was analyzed in EC extracts after TNF α stimulation, in the presence of the γ -secretase inhibitor L685,458 (10 μ M), to prevent further proteolytic degradation of the VE-cadherin cytoplasmic domain (17). Under these conditions, the appearance of VE-cyto was clearly detected upon TNF α challenge, while it was not detected in untreated cells (Figure 4). In addition, VE-cyto generation was strongly impaired by pretreatment with PP2 (10 μ M), genistein (50 fLM), or Src-specific siRNA (Figure 4). These data further confirm the role of Src kinase in TNF α -induced VE-cadherin extracellular domain cleavage and VE-cyto generation.

The balance between the activities of protein tyrosine kinases and phosphotyrosine phosphatases determines the level of tyrosine phosphorylation. To further confirm the importance of tyrosine phosphorylation processes in TNF α -induced VE-cadherin cleavage, the next experiment was performed in HUVECs pretreated or not with sodium pervanadate, a strong tyrosine phosphatase inhibitor. Importantly, we showed that tyrosine phosphatase blockade led to a tremendous increase in VE-cyto generation upon cytokine treatment as compared to nonpretreated cells (further details are available at <http://www-dsv.cea.fr/irtsv/bci/jea/arthritis-supplement>). Genistein treatment still decreased the generation of VE-cyto under both conditions. This result demonstrates that inhibition of tyrosine phosphatase activities facilitates VE-cadherin cleavage and further confirms the involvement of tyrosine phosphorylation processes in TNF α -induced VE-cadherin cleavage.

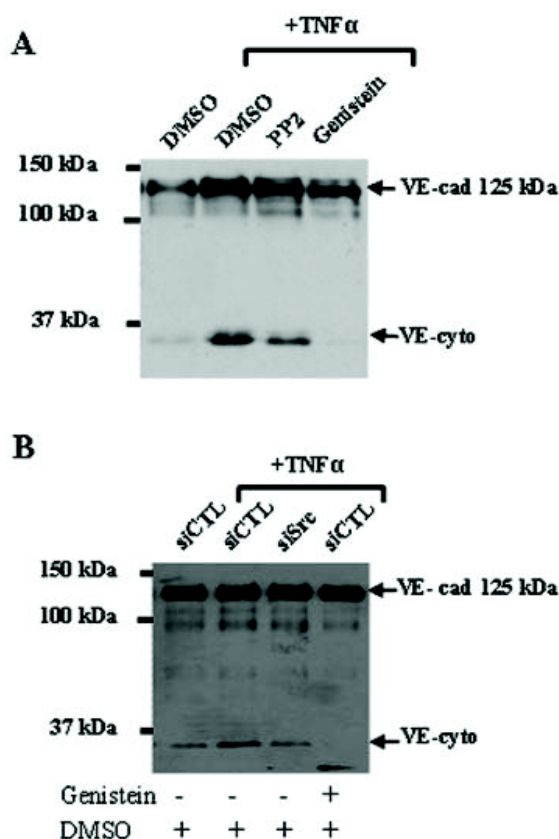


Figure 4. Implication of Src in generation of VE-cadherin (VE-cad) cytoplasmic tail upon TNF α treatment. **A**, Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were pretreated with the γ -secretase inhibitor L685,458 (5 fLM) for 15 minutes before being incubated with TNF α (100 ng/ml) in the presence of DMSO (0.1%), genistein (50 fLM), or PP2 (10 fLM) for 45 minutes. HUVECs pretreated with L685,458 (5 fLM) and DMSO (0.19%) served to monitor basic VE-cadherin cleavage. Endothelial cell extracts (10 fLg) were analyzed to detect the 35-kd VE-cadherin cytoplasmic domain (VE-cyto) and the 125-kd full-length protein. Identical gel loading was confirmed by (3-actin immunoblot). **B**, HUVECs at 80% confluence were transfected with c-Src-targeted small interfering RNA (siSrc) or control small interfering RNA (siCTL). After 48 hours, cells were pretreated with the γ -secretase inhibitor L685,458 (10 fLM) for 15 minutes and then treated for 45 minutes with TNF α in the presence or absence of genistein as indicated. Proteins were analyzed as described in A. Results are representative of 3 independent experiments. See Figure 1 for other definitions.

MMP activities are required for cellular conversion of 125-kd VE-cadherin to 90-kd and 35-kd proteins upon TNF α challenge. A large body of evidence has shown that MMPs are involved in joint destruction in RA and are associated with endothelial dysfunction (25). We thus examined whether MMPs could target VE-cadherin. To that purpose, cell medium was analyzed for the presence of VE-90 after a

dose-response experiment performed using APMA, a broad-spectrum activator of MMPs (26). As shown in Figure 5A, increasing concentrations of APMA from 10 to 100 μ M induced a dose-dependent VE-90 release in HUVEC media. In Figure 5B, analysis of the corresponding cellular extracts demonstrated that APMA treatment induced a dose-dependent decrease in the 125-kd full-length protein and concomitantly a strong increase in VE-cyto generation. This result confirmed that VE-cadherin is a substrate for MMPs which generate the same 90-kd fragment released in HUVEC medium as seen upon TNF α stimulation.

The involvement of MMPs in TNF α -induced VE-cadherin cleavage was further confirmed by the use of GM6001, a broad-spectrum inhibitor of MMPs. HUVECs were treated for 15 minutes with GM6001 (10 μ M) prior to TNF α stimulation. Cell lysates and

conditioned media were analyzed for the presence of VE-cyto and VE-90, respectively. As shown in Figures 5C and D, the MMP inhibitor drastically decreased TNF α -induced VE-90 release in cell media and almost completely abrogated VE-cyto generation, without affecting cell viability (further details are available at <http://www-dsv.cea.fr/irts/bci/jea/arthritis-supplement>). Several MMPs, such as MMPs 2 and 9, and the metalloproteinase ADAM-10 have been involved in VE-cadherin cleavage (14–17). The MMPs are initially synthesized as inactive zymogens with a propeptide domain that should be removed to render the enzyme active (27). We further examined the presence of MMPs (proenzyme and enzymes) in conditioned media from APMA-treated HUVECs. This analysis was performed using specific antibodies for each species. ProMMP-2 (the 72-kd precursor form) was detected in a time- and

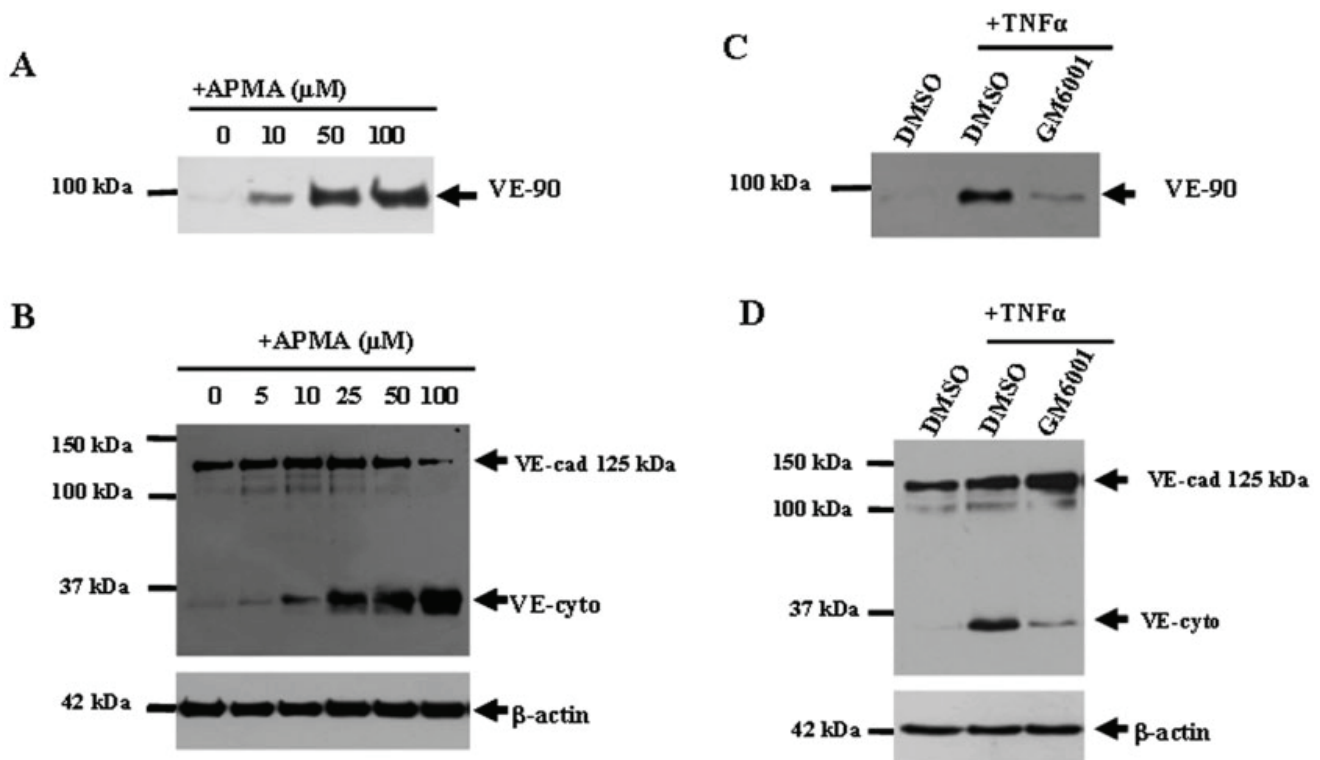


Figure 5. Requirement of metalloproteinase activities for cellular conversion of 125-kd VE-cadherin (VE-cad) to 90-kd and 35-kd proteins upon TNF α challenge. **A**, Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were serum-starved overnight, pretreated with L685,458 (10 μ M) for 15 minutes, and treated for 45 minutes with increasing concentrations of APMA. Treated cell media were analyzed for VE-90 release as described in Figure 1. **B**, The corresponding cell extracts were analyzed by Western blotting for VE-cadherin cytoplasmic domain (VE-cyto). Blots were stripped and reprobed with anti- β -actin as a control for gel loading. **C**, Serum-starved HUVECs were pretreated with L685,458 (10 μ M), DMSO vehicle (0.1%), or GM6001 (10 μ M) for 15 minutes prior to TNF α challenge. Cell media were then collected and analyzed for VE-90. **D**, The corresponding cell extracts (10 mg) were analyzed by Western blotting for 125-kd VE-cadherin and VE-cyto. Blots were stripped and reprobed with anti- β -actin as a control for gel loading. Arrows indicate positions of 125-kd VE-cadherin and VE-cyto. Results are representative of 3 independent experiments. See Figure 1 for other definitions.

dose-dependent manner upon APMA challenge, whereas MMP-9 (92 kd) was not detectable at any time tested (further details are available at <http://www-dsv.cea.fr/irtsv/bci/jea/arthritis-supplement>). The proMMP-2 maturation was correlated to the time-dependent VE-90 release (further details are available at <http://www-dsv.cea.fr/irtsv/bci/jea/arthritis-supplement>), as its proenzyme decreased according to APMA concentration. The detection of active MMP-2 was confirmed by a zymography experiment showing a time-dependent relationship between VE-90 generation and proMMP-2 maturation into active MMP-2 (further details are available at <http://www-dsv.cea.fr/irtsv/bci/jea/arthritis-supplement>).

Both ADAM-10 precursor (85 kd) and active forms (60 kd) were detectable in cell lysates, but no differences were found upon APMA treatment in the balance of the ADAM-10 precursor and active forms (further details are available at <http://www-dsv.cea.fr/irtsv/bci/jea/arthritis-supplement>). Altogether, these results strongly suggest the requirement of MMPs in TNFa-induced VE-90 generation and more specifically the involvement of MMP-2 activity in VE-90 release.

Soluble 90-kd VE-cadherin is present in RA patient sera and correlates with the Disease Activity Score (DAS).

Because TNFa is the major proinflammatory cytokine involved in RA, we next determined whether RA patients exhibited a truncated form of VE-cadherin that could be detected in their sera. We studied 63 patients from a DMARD- and corticosteroid-naïve RA population (19) whose baseline characteristics are summarized in Table 1. Diluted patient sera were

analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with an anti-VE-cadherin antibody directed against its extracellular domain. One immunoreactive band of 90 kd was detected in all RA patient sera (not shown). Based on the immunoreactivity of the band and its molecular weight, we concluded that this fragment corresponded to the VE-90 observed in HUVEC conditioned media upon TNFa treatment.

VE-90 immunoreactive bands detected in all sera were quantified by densitometry using ImageJ software. The data were analyzed in order to know whether titers of soluble VE-cadherin were related to disease activity. In this respect, we found a relationship between this marker and the DAS (28) reflecting global disease activity, both at baseline ($r = 0.35$, $P = 0.007$) and over the first year of followup ($r = 0.29$, $P = 0.02$) when considering their mean values. This correlation was not due to traditional parameters of inflammation since no link was observed between soluble VE-cadherin and ESR or CRP level. Furthermore, no relationship was shown between soluble VE-90 and markers of autoimmunity (RF and anti-CCP-2) or osteoarticular destruction (Sharp scores) measured at baseline. These results demonstrate for the first time the occurrence of VE-90 release in RA disease.

DISCUSSION

Patients with RA have an increased morbidity and mortality due to cardiovascular disease (CVD). Traditional cardiovascular risk factors cannot fully explain the increase, but inflammation has been shown to contribute to the increased CVD in RA patients. Inflammation leads to endothelial dysfunction, a sign of very early atherosclerosis, which can be assessed by impaired endothelium-dependent flow-mediated vasodilation of peripheral arteries, measured by ultrasonography (29). Another potential way to examine endothelial dysfunction in RA might be to examine whether the most targeted cytokine in the disease, TNFa, could affect the adhesive properties of a major component of endothelial adherens junctions, VE-cadherin.

The above data demonstrate that TNFa induced a dose-dependent release of VE-cadherin extracellular domain and a decrease of the full-length protein expression on the cell surface. This observation of great potential interest suggests that VE-cadherin adhesive properties appeared to be regulated by TNFa and might contribute to the reported TNFa-induced endothelial permeability. A wide group of transmembrane proteins, including adhesion molecules, TNFa receptor, transforming growth factor α , angiotensin-converting

Table 1. Demographic, clinical, biologic, and radiographic characteristics of the 63 patients included in the present study*

Age, years	53 (26–76)
Female-to-male ratio	1.86
DAS	2.95 (1.31–7.21)
ESR, mm/hour	12 (2–110)
CRP level, mg/liter†	6 (5–185)
RF positive, %	34
Anti-CCP-2 positive, %	27
RF titer, IU/ml‡	0 (0–938)
Anti-CCP-2 titer, AU§	0 (0–100)
Modified Sharp scores	
Erosion	0 (0–6)
Total	0 (0–16)
VE-cadherin, AU	37 (6–100)

* Except where indicated otherwise, values are the median (range). DAS = Disease Activity Score; ESR = erythrocyte sedimentation rate; CRP = C-reactive protein; RF = rheumatoid factor; anti-CCP-2 = anti-cyclic citrullinated peptide 2.

† Normal <5 mg/liter.

‡ By latex fixation test, normal <20 IU/ml.

§ Normal <10 arbitrary units (AU).

enzyme, (3-amyloid precursor protein, and syndecan, undergo ectodomain cleavage (30). In numerous cases, this process is activated by phorbol 12-myristate 13-acetate, a well-known activator of protein kinase C, indicating the involvement of phosphorylation as an important regulatory mechanism of these proteins' cleavage.

VE-cadherin tyrosine phosphorylation is a mechanism involved in endothelial cell-cell dissociation and increased permeability (8,13,31). While the role of tyrosine kinases has been largely established in this process, the precise molecular mechanisms remain elusive. Of interest, in this study we demonstrated the implication of tyrosine kinases such as the Src family kinases in TNF α -induced VE-cadherin cleavage. Increasing Src kinase activity has been associated with VE-cadherin phosphorylation, adherens junction dissociation, and endothelial permeability augmentation (22). Thus, Src activity can also be involved in the reported TNF α -induced endothelial permeability through VE-cadherin cleavage. Another interesting point is that the observed time-dependent and dose-dependent release of VE-90 upon TNF α stimulation was delayed as compared to the reported time-dependent phosphorylation of the protein. In addition, our results obtained using tyrosine kinases and phosphatase inhibitors demonstrated the correlation between both events. These observations strongly support the hypothesis that VE-cadherin tyrosine phosphorylation in its cytoplasmic domain is an early event which precedes the cleavage of its extra-cellular domain. Our data are consistent with those of 2 previous studies independently reporting VE-cadherin tyrosine phosphorylation and cleavage of its extracellular fragment upon thrombin stimulation (17,32).

Several lines of evidence suggest that proteolytic cleavage of cell surface proteins (i.e., ectodomain shedding [33]) appears to be mediated by members of the metzincin superfamily of zinc-dependent proteinases that include the MMPs and ADAMs. The MMPs and adamalysins are considered to be major mediators of cartilage destruction in RA (25,34). Interestingly, MMPs 2, 7, and 9 were the most documented to induce VE-cadherin shedding in several circumstances, namely, apoptosis, diabetic retinopathy, and dengue virus infection (14,35,36). In addition, adamalysins such as ADAMs 9 and 10 have been shown to mediate VE-cadherin cleavage during retinal neovascularization and in HUVECs upon thrombin stimulation, respectively (17,37). These observations are consistent with our results and support the hypothesis that TNF α -induced VE-cadherin cleavage could be mediated by several of these proteinases. Further investigations are ongoing to

determine more precisely whether one of these proteinases is specifically involved in VE-cadherin cleavage upon TNF α stimulation. Our preliminary data suggest a potential role of MMP-2 activity in this process. In addition, the regulation of metalloproteinase catalytic activity through phosphorylation processes is another question to be addressed. Because VE-cadherin extracellular domain is of major importance for cell-cell adhesiveness, it remains to be seen whether the VE-90 release is a general process causing endothelial permeability in inflammation and edema.

Elevated levels of soluble VE-cadherin have been reported to be associated with diabetic retinopathy and coronary atherosclerosis (38,39). However, the molecular weight of the soluble protein was not documented and the mechanisms involved in this process were not studied. Despite its predominant role as a gatekeeper for neutrophil transmigration, VE-cadherin has never been studied in RA. The current study is the first to demonstrate the presence of soluble VE-cadherin in 63 RA patients and to investigate its potential clinical relevance in the disease. This observation is consistent with results of our *in vitro* experiments on HUVECs stimulated with TNF α . It remains to be examined whether the early effect of TNF α on VE-90 release may be related to the long-range effect of this cytokine in RA. Our preliminary data have highlighted a correlation between soluble VE-cadherin levels in sera from patients with early RA and their Disease Activity Scores. Actually, the DAS is one of the most important tools for evaluating RA disease activity and the responsiveness of each patient to therapy. Interestingly, this relationship seems independent of CRP levels, suggesting that VE-90 could constitute a new marker of disease activity followup, particularly in the subset of RA patients with no CRP level increase.

A routine biologic assay for the detection and quantification of soluble VE-cadherin in RA patient sera is required. The development of an easily applied diagnostic-type assay like an enzyme-linked immunosorbent assay would be of major interest. To that end the sequencing of VE-90 from RA patient sera is under way to define the best strategy for producing the same fragment in human cells that will be used to develop an internal standard curve for determining precisely the concentration of VE-90 in patient sera. Therefore, further clinical trials will be of major importance in determining whether VE-90 is useful for predicting prognosis and/or drug responsiveness, especially for new therapies in RA, including TNF α inhibitors (infliximab, adalimumab, etanercept, certolizumab pegol) (40–42).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Vilgrain had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Sidibé, Mannic, Vilgrain.

Acquisition of data. Sidibé, Mannic, Arboleas, Subileau, Vandhuick, Le Loët, Vittecoq, Vilgrain.

Analysis and interpretation of data. Sidibé, Mannic, Gulino-Debrac, Bouillet, Jan, Vittecoq, Vilgrain.

REFERENCES

- Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1427–30.
- Mariette X, Gottenberg JE, Ravaud P, Combe B. Registries in rheumatoid arthritis and autoimmune diseases: data from the French registries. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50:222–9.
- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010;376:1094–108.
- Kramer HR, Giles JT. Cardiovascular disease risk in rheumatoid arthritis: progress, debate, and opportunity. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011;63:484–99.
- Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:473–88.
- Vestweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol* 2009;19:8–15.
- Wallez Y, Vilgrain I, Huber P. Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med* 2006;16:55–9.
- Angelini DJ, Hyun SW, Grigoryev DN, Garg P, Gong P, Singh IS, et al. TNF- α increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L1232–45.
- Wallez Y, Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:794–809.
- Shasby DM, Ries DR, Shasby SS, Winter MC. Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L1330–8.
- Hermant B, Bibert S, Concord E, Dublet B, Weidenhaupt M, Vernet T, et al. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem* 2003;278:14002–12.
- Hudry-Clergeon H, Stengel D, Ninio E, Vilgrain I. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *FASEB J* 2005;19:512–20.
- Friedl J, Puhlmann M, Bartlett DL, Libutti SK, Turner EN, Gnant MF, et al. Induction of permeability across endothelial cell monolayers by tumor necrosis factor (TNF) occurs via a tissue factor-dependent mechanism: relationship between the procoagulant and permeability effects of TNF. *Blood* 2002;100:1334–9.
- Herren B, Levkau B, Raines EW, Ross R. Cleavage of β -catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 1998;9:1589–601.
- Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002;70:561–73.
- Wu WB, Huang TF. Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis. *Exp Cell Res* 2003;288:143–57.
- Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, Ludwig A, Blobel CP, Saftig P, et al. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res* 2008;102:1192–201.
- Garnier-Raveaud S, Usson Y, Cand F, Robert-Nicoud M, Verdetti J, Faury G. Identification of membrane calcium channels essential for cytoplasmic and nuclear calcium elevations induced by vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Growth Factors* 2001;19:35–48.
- Goeb V, Dieude P, Daveau R, Thomas-L'Ottelier M, Jouen F, Hau F, et al. Contribution of PTPN22 1858T, TNFR11 196R and HLA-shared epitope alleles with rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibodies to very early rheumatoid arthritis diagnosis. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1208–12.
- Goeb V, Dieude P, Vittecoq O, Mejjad O, Menard JF, Thomas M, et al. Association between the TNFR11 196R allele and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1056–62.
- Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, Cand F, Christe G, Gulino-Debrac D, et al. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* 2005;96:384–91.
- Potter MD, Barbero S, Cheresch DA. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and β -catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem* 2005;280:31906–12.
- Allingham MJ, van Buul JD, Burridge K. ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J Immunol* 2007;179:4053–64.
- Nottebaum AF, Cagna G, Winderlich M, Gamp AC, Linnepe R, Polaschegg C, et al. VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med* 2008;205:2929–45.
- Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. Metalloproteinases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15:805–29.
- Merlos-Suarez A, Ruiz-Paz S, Baselga J, Arribas J. Metalloproteinase-dependent protransforming growth factor- α ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *J Biol Chem* 2001;276:48510–7.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827–39.
- Van der Heijde DM, van 't Hof MA, van Riel PL, Theunisse LM, Lubberts EW, van Leeuwen MA, et al. Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. *Ann Rheum Dis* 1990;49:916–20.
- Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257–65.
- Blobel CP. Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:606–12.
- Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF therapy, from rationale to standard of care: what lessons has it taught us? *J Immunol* 2010;185:791–4.
- Zhao Y, Davis HW. Hydrogen peroxide-induced cytoskeletal rearrangement in cultured pulmonary endothelial cells. *J Cell Physiol* 1998;174:370–9.
- Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 1993;62:515–41.
- Kontinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, et al. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999;58:691–7.

35. Ichikawa Y, Ishikawa T, Momiyama N, Kamiyama M, Sakurada H, Matsuyama R, et al. Matrilysin (MMP-7) degrades VE-cadherin and accelerates accumulation of β -catenin in the nucleus of human umbilical vein endothelial cells. *Oncol Rep* 2006;15:311–5.
36. Luplertlop N, Misse D, Bray D, Deleuze V, Gonzalez JP, Leard-kamolarn V, et al. Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep* 2006;7:1176–81.
37. Guaiquil V, Swendeman S, Yoshida T, Chavala S, Campochiaro PA, Blobel CP. ADAM9 is involved in pathological retinal neo-vascularization. *Mol Cell Biol* 2009;29:2694–703.
38. Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, Sakabe K, Onose Y, Fukuda N. Elevated concentration of soluble vascular endothelial cadherin is associated with coronary atherosclerosis. *Circ J* 2004;68:1–5.
39. Navaratna D, McGuire PG, Menicucci G, Das A. Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes* 2007;56:2380–7.
40. Keystone EC, Kavanaugh AF, Sharp JT, Tannenbaum H, Hua Y, Teoh LS, et al. Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheum* 2004;50:1400–11.
41. Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, Gough A, Kalden J, Malaise M, et al. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2004;363:675–81.
42. St.Clair EW, van der Heijde DM, Smolen JS, Maini RN, Bathon JM, Emery P, et al, for the Active-Controlled Study of Patients Receiving Infliximab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis of Early Onset Study Group. Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* 2004;50:3432–43.

I.5 Supplemental data

I.5.1 Supplemental methods

Western blotting: Proteins (40 µg) from the endothelial cell extracts was analyzed by SDS-PAGE (12 % Acrylamide, 0.2% bis-acrylamide). Proteins were then transferred from the gel to nitrocellulose for 1 h and the residual binding sites were blocked by incubating the filters for 1 h in PBS containing 0.05 % (v/v) Tween 20 and 5 % (w/v) non-fat milk. The blots were subsequently incubated for 1 h with 1 µg/mL of specified primary antibodies. After being washed, the blots were incubated for 1 h with adequate horseradish- peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted in PBS containing 0.05 % (v/v) Tween 20. Immunoreactive proteins were visualized by chemiluminescence after three time washes.

SDS-PAGE zymography: The procedure for zymography of gelatinase to detect secreted MMP2 or MMP9 in APMA-treated HUVEC media followed the method described previously by Kleiner et al ((Kleiner and Stetler-Stevenson 1994) supplemental reference). Briefly, cell media were mixed with 1x non-reducing sample buffer (0.125M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.05% bromophenol blue) and were subjected to electrophoresis through 12% polyacrylamide gel copolymerized with 0.2% of gelatine at 4°C. After electrophoresis, the SDS was removed from the gels by washing twice with 2.5% Triton X-100 for 20 min in order to renature the enzymes. The gels were then incubated for 20 h at 37°C in a substrate buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, and 0.02% NaN₃. Gels were stained with Imperial Protein Stain (Thermo scientific #24615) and destained in water until clear proteolytic bands appeared on the contrasting blue background.

Pharmacological inhibitor toxicity analysis: HUVECs were treated either with DMSO, GM6001 (10 µM), genistein (50 µM) or PP2 (10 µM) as they were used in our experiments for an hour to test their toxicological effect. Cells were then washed with Phosphate Buffer Saline (without Ca²⁺ or Mg²⁺) and treated with trypsin/EDTA to take them off the dishes. Once cells were detached, trypsin/EDTA effect was removed by adding fetal bovine serum (final concentration of 10%). Apoptotic cells were estimated by measuring the cell size (which is related to cell volume) with Scepter™ Handheld Auto-

mated Cell Counter (Millipore) according to the manufacturer's instruction. Mean of living HUVEC size ranged from 12 to 20 μm . HUVECs having a size lower than 10 μm were considered apoptotic. Then the percentages of apoptotic cells (EAC) were estimated and indicated in every graph.

I.5.2 Supplemental references

1. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem.* 1994 May 1;218(2):325-9.

I.5.3 Legends for supplemental figures

Supplemental 1: Pharmacological inhibitor toxicity assessment

Toxicity of the inhibitors used in our study was studied as described in supplemental methods section. Apoptotic cells were estimated by measuring the cell size with Scepter™ cytometer. Mean of living HUVEC size ranged from 12 to 20 μm . HUVECs having a diameter lower than 10 μm were considered apoptotic. Then the percentages of apoptotic cells (EAC) were estimated and indicated in every graph. Inhibitor treatments did not induce more alteration in cell viability compared to DMSO (vehicle control) treatment.

Supplemental 2: Effect of Tyrosine kinase/phosphatase activity balance on the regulation of TNF α -induced VE-cadherin proteolysis

HUVECs pretreated with DMSO or genistein (50 μM) for 15 min, were then treated or not with TNF α (100 ng/ml) for 45 min. HUVECs were pre-treated with or without sodium pervanadate for 15 min as indicated above. Cells were further treated with TNF α (100 ng/ml) in presence of genistein (50 mM) or DMSO. Cell extracts were analyzed by western blotting for VE-cadherin cytoplasmic domain generation. Arrows on the right indicate the position of the full length VE-cadherin (125 kDa) and the cytoplasmic domain (VE-cyto, 35 kDa). This experiment is representative of 3 independent experiments.

Supplemental 3: Correlation of VE-cadherin cleavage with MMP-2 maturation

Increasing concentrations of APMA (0 up to 25 μM) were applied onto HUVECs for 0, 30, 60 and 90 min. **A.** The conditioned media were collected and analyzed as described in Material and Methods for the detection of VE-90, MMP2 precursor and MMP9. The membrane was reprobed with an antibody

specific to the precursor form of MMP2 without stripping the anti-VE-cadherin antibody. The membrane was afterwards stripped and reprobed with an antibody specific to MMP9. Samples at time= 0 min were not represented as no proteins were detectable at that time, **B.** Kinetic representation of APMA-induced VE-90 generation upon three concentrations of APMA(0, 10 and 25 μ M). The intensity of each band corresponding to VE-90 was quantified by densitometry on autoradiography (presented in A), **C.** Kinetic representation of the precursor form of MMP2 (proMMP2) appearance/disappearance upon three concentrations of APMA (0, 10 and 25 μ M) . The intensity of each band corresponding to proMMP2 and VE-90 was measured on autoradiography (presented in A), and expressed in arbitrary unit (A.U). Error bars indicate sd. The results are representative of at least three independent experiments.

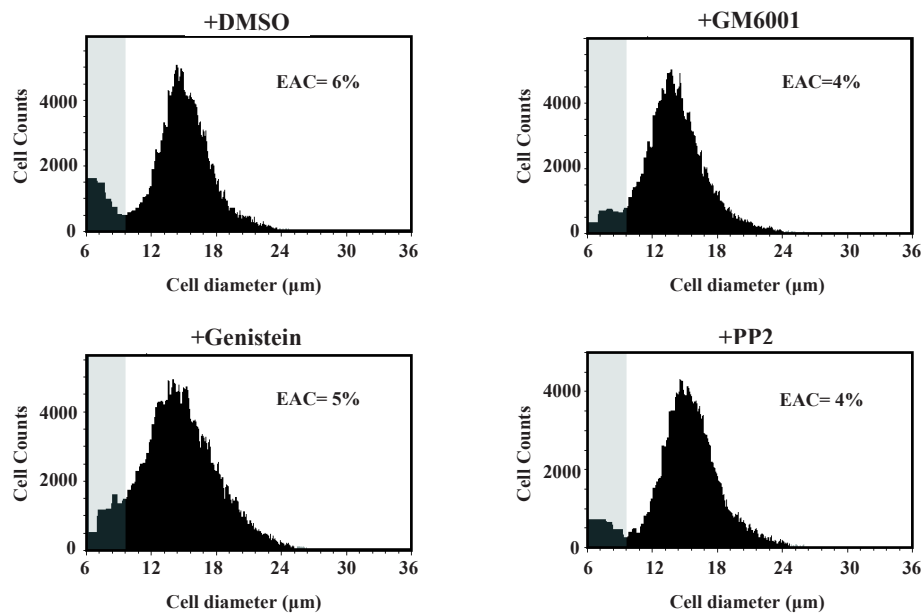
Supplemental 4: Effect of APMA on ADAM-10 activation

HUVECs were treated with increasing concentrations of APMA (0 up to 25 μ M), for 60 and 90 min. The cell lysates were analyzed by western blot with specific antibody to detect ADAM-10 precursor and active forms.

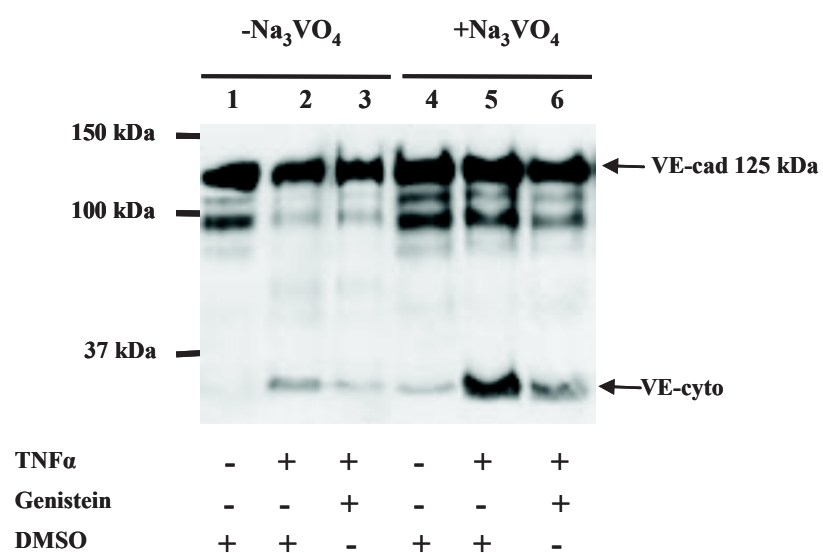
Supplemental 5: Gelatin zymography gel showing MMP2 precursor and active form

The same cell media as in supplemental 3 were analyzed by gelatin zymography to detect gelatinases (MMP2 and MMP9 pro/active form). Only MMP2 forms were detectable in our experimental time. The pattern of MMP2 precursor was the same when analyzed either with western blot or zymography techniques. MMP2 active form correlated with cleaved VE-cadherin (see supplemental 3).

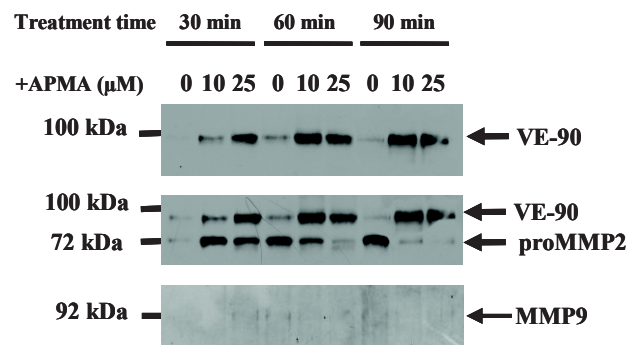
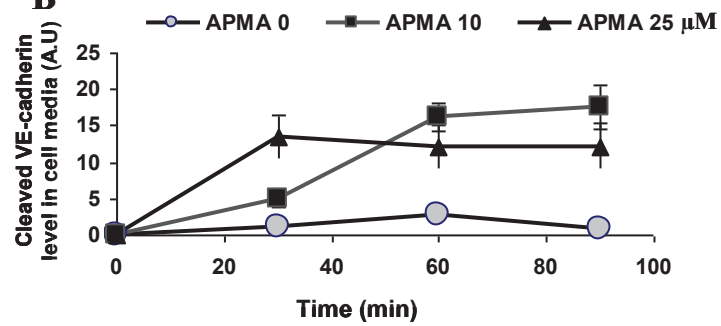
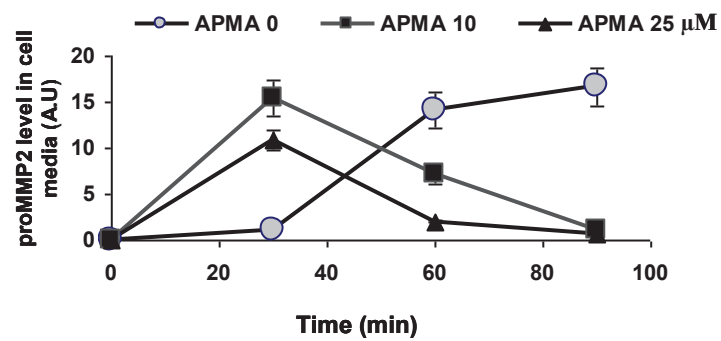
I.5.4 Supplemental figures



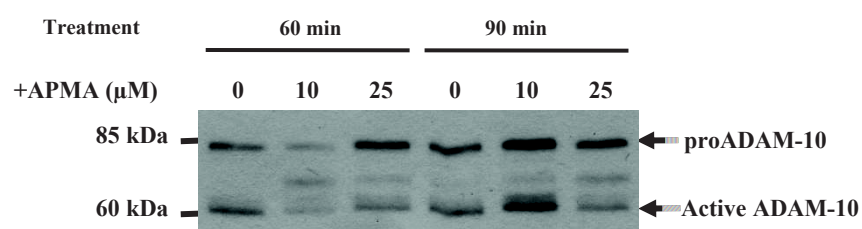
Supplemental 1



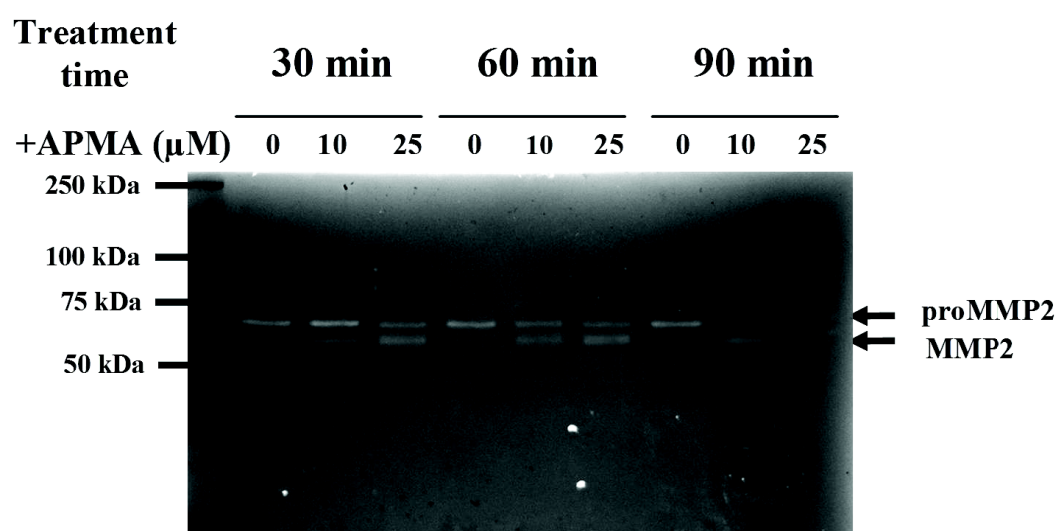
Supplemental 2

A**B****C**

Supplemental 3



Supplemental 4



Supplemental 5

I.6 Discussion et perspectives de l'article 1

Ce travail a permis de montrer que $\text{TNF}\alpha$, un facteur crucial dans la PR, induit le clivage de la VE-cadhérine de façon dépendante de tyrosine kinase de la famille Src et de MMPs dont MMP2. C'est un nouveau mode d'action du $\text{TNF}\alpha$ sur la VE-cadhérine, qui peut participer à l'augmentation de la perméabilité vasculaire observée sous l'action de cette cytokine (Friedl, Puhlmann et al. 2002). Le clivage de la VE-cadhérine a été décrit dans plusieurs études mais la taille exacte du fragment extracellulaire libéré a été très peu documentée. La phosphorylation de la VE-cadhérine sur tyrosine sous l'action de différents stimuli a été corrélée à une augmentation de perméabilité vasculaire (Friedl, Puhlmann et al. 2002, Angelini, Hyun et al. 2006), et pour certains comme VEGF et la thrombine, la phosphorylation et le dosage de VE-cadhérine soluble sont décrits mais là encore la taille du fragment soluble n'est pas donnée (Donners, Wolfs et al. 2010). (Zhao and Davis 1998, Schulz, Pruessmeyer et al. 2008). Le lien étroit entre phosphorylation et clivage de la VE-cadhérine en réponse au $\text{TNF}\alpha$ est une première description qui repose sur la cinétique d'apparition de ces deux événements l'un par rapport à l'autre. Le lien entre les activités tyrosine kinases et MMPs protéases, s'il existe, n'a pas encore été investigué, néanmoins plusieurs hypothèses sont envisageables pour l'expliquer:

- 1- La kinase Src activée par le $\text{TNF}\alpha$ pourrait provoquer la phosphorylation de la VE-cadhérine entraînant ainsi un changement de conformation de la protéine la rendant plus sensible à la protéolyse par les MMPs (voir Figure I.1). Des expériences complémentaires seront nécessaires pour établir le lien moléculaire entre les deux événements. Il serait en effet intéressant d'identifier le site de phosphorylation de la VE-cadhérine en réponse au $\text{TNF}\alpha$ puis muter ce site et co-transfecter la protéine mutante et le récepteur du $\text{TNF}\alpha$ dans des CHO pour étudier la génération du fragment extracellulaire.
- 2- Une éventuelle régulation de l'activité enzymatique des MMPs par phosphorylation sur tyrosine pouvant expliquer l'effet radical de l'inhibiteur des tyrosine kinases sur le clivage de la VE-cadhérine. Des expériences d'immunoprécipitation des protéases et de détection de leur niveau de phosphorylation sur tyrosine par westernblot seraient réalisables de même que leur localisation après action du $\text{TNF}\alpha$.
- 3- L'augmentation de flux calcique sous l'action de la thrombine ou du $\text{TNF}\alpha$ par l'intermédiaire de l'activité de la kinase Src a été montré (Tiruppathi, Naqvi et al. 2001). Le flux calcique est connu pour avoir un effet inducteur de la perméabilité endothéliale et a été proposé par Schulz et al pour activer la protéase ADAM-10 (Tiruppathi, Minshall et al. 2002, Schulz, Pruessmeyer et al. 2008). Il reste à démontrer si des inhibiteurs du flux calcique inhibe le clivage de la VE-cadhérine induit par $\text{TNF}\alpha$ et si l'activité de MMP-2 est dépendante du calcium. Enfin, le clivage direct de la molécule par un panel de protéases pourrait être étudié in vitro.

Ce travail a également permis de montrer un intérêt pour la VE-cadhérine soluble dans la PR : en effet, la VE-cadhérine clivée est retrouvée dans la circulation sanguine de patients polyarthritiques et son

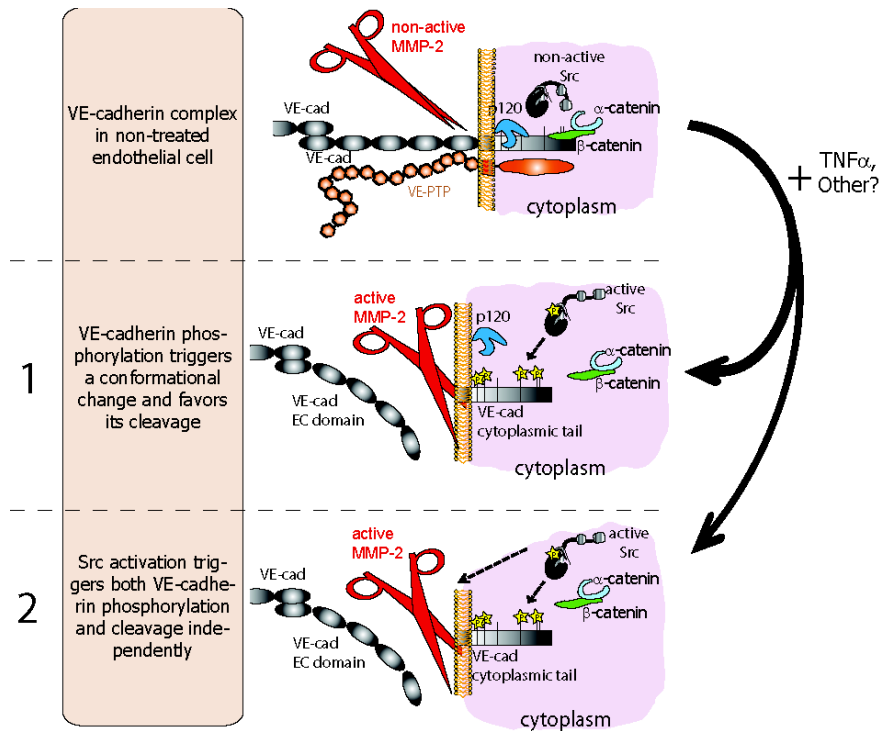


Figure I.1: Phosphorylation et clivage de la VE-cadhérine induits par TNF α . 1. La phosphorylation de la VE-cadhérine provoque un changement de conformation de la protéine et le clivage de son domaine extracellulaire ; 2. Phosphorylation et clivage de la VE-cadhérine sont indépendants.

taux est corrélé à l'activité de la maladie. Comme expliqué dans les chapitres précédents, on sait que l'activité de la polyarthrite rhumatoïde est liée de façon étroite à l'inflammation de la membrane synoviale. On sait par ailleurs que le traitement précoce de la polyarthrite rhumatoïde est essentiel pour ralentir l'évolution de la maladie et éviter à long terme des destructions articulaires irréversibles et le handicap. On sait également qu'il y a un grand risque de maladies cardiovasculaires dans la PR expliqué en partie par l'inflammation chronique qui favorise un dysfonctionnement de l'endothélium et peut être à l'origine de l'athérogénèse. Chez le patient polyarthritique, l'analyse des artères périphériques par échographie Doppler permet d'évaluer la fonction de l'endothélium. Cependant cette méthodologie ne rend pas compte des processus physiopathologiques et inflammatoires précédant l'athérogénèse. Il apparaît donc important de disposer d'outils ou de biomarqueurs pour évaluer le dysfonctionnement endothélial chez les patients atteints de PR. La VE-cadhérine soluble sera peut-être le marqueur d'intérêt pour suivre l'apparition du dysfonctionnement endothélial et sa gravité. Il est ainsi envisageable d'analyser la VE-cadhérine soluble au cours du suivi des patients pour savoir si elle conserve sa valeur indicative d'activité de la maladie. De nombreuses études cliniques sont en cours et la robotisation du dosage devrait permettre l'analyse à plus grande échelle de ce marqueur en attente de validation. De plus, il s'avèrera peut-être d'un grand intérêt dans le suivi de patients traités par biothérapies.

Chapitre II: Implication de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine en physiologie et pathologie

II.1 Contexte scientifique

L'implication de la voie du VEGF/Flk-1 sur la phosphorylation de la VE-cadhérine a été montrée *in vitro* comme *in vivo* (Esser, Lampugnani et al. 1998, Weis, Shintani et al. 2004), mais elle avait initialement été montrée comme ayant un rôle majeur dans l'angiogénèse du corps jaune après l'ovulation pendant le cycle ovarien (Ferrara, Chen et al. 1998). Des travaux *in vivo* chez la souris réalisés au laboratoire, ont montré que la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine est un processus qui ne s'observe que dans des organes dont l'angiogénèse est soumise à une régulation endocrine (ovaire, utérus) alors que dans les organes adultes quiescents, cette phosphorylation n'est pas détectée sans doute par une régulation due aux activités tyrosine phosphatases (Lambeng, Wallez et al. 2005). Dans un modèle murin d'induction ovarienne par injection de PMSG/hCG, la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine dans l'ovaire et l'utérus est très fortement augmentée, ce qui suggère que cette modification covalente de la protéine ne peut avoir lieu que dans des conditions d'angiogénèse physiologique contrôlée. En effet, l'endomètre et l'ovaire sont des tissus dynamiques uniques qui subissent des changements cycliques importants en réponse aux fluctuations des taux d'hormones stéroïdes dont les estrogènes en particulier, qui sont capables de réguler l'expression du VEGF (Hyder, Nawaz et al. 2000). Une étude *in vitro* menée au laboratoire a permis de démontrer que le VEGF induit la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine, sur le site Y685 par l'intermédiaire de la kinase Src *in vitro*, indiquant que la phosphorylation de la VE-cadhérine, dans les conditions d'angiogénèse ou de perméabilité vasculaire *in vivo*, pourrait se faire sur ce site spécifique (Wallez, Cand et al. 2007). Ces résultats suggèrent que cette modification spécifique de la molécule pourrait avoir une implication dans ces processus physiologiques *in vivo*, d'autant que le site Y685 phosphorylé de la VE-cadhérine serait un site d'interaction pour le domaine SH2 de la kinase CSK, kinase inhibitrice de Src et donc de la prolifération cellulaire (Baumeister, Funke et al. 2005).

II.2 Objectifs des travaux de recherche

Les résultats du laboratoire obtenus *in vitro* ont soulevé deux questions majeures :

- 1- Est-ce que la VE-cadhérine est phosphorylée sur le site Y685 dans des conditions d'angiogénèse ou de perméabilité *in vivo* ?
- 2- Si oui, quel est le rôle de cette phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine *in vivo* dans la physiologie et physiopathologie vasculaire ?

Dans le but de répondre à ces questions, la recherche du site Y685 phosphorylé a été réalisée dans l'ovaire et l'utérus de souris traitées avec PMSG/hCG, et également au cours du cycle ovarien physiologique sans stimulation hormonale et une souris knock-in VE-Y685F a été produite où la tyrosine Y685 a été mutée en phénylalanine, acide aminé identique mais sans radical hydroxyle donc non phosphorylable. Le phénotypage de cette souris a été réalisé et ce modèle murin a été utilisé pour la pathogénèse de la PR

Les résultats de ce travail sont pour partie soumis au journal « Journal of Experimental Medicine ». Les principaux résultats de ces travaux sont présentés ci-après.

II.3 Principaux résultats

L'analyse de la phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine, a nécessité le développement d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de Y685 qui a été fabriqué par Eurogentech (Belgique) contre un peptide synthétique de 10 acides aminés encadrant la tyrosine phosphorylée. Cet anticorps a été doublement purifié sur deux colonnes comportant le peptide phosphorylé ou non, greffé de façon covalente. Les fractions purifiées nous ont été envoyées par Eurogentech et des tests en immunofluorescence et par westernblot, ont été réalisés dans le but de valider cet anticorps. Nous avons montré que le peptide n'était reconnu que lorsqu'il était phosphorylé, et nous avons confirmé sa spécificité par des expériences de compétition vis à vis du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine phosphorylé ou non par Src et muté sur le site Y685. De plus, l'antiphosphosite reconnaît la VE-cadhérine dans les cellules endothéliales HUVEC stimulées par VEGF, à la fois en western blot et en immunofluorescence.

L'étude de la présence de ce phosphosite *in vivo* dans l'angiogénèse physiologique a été réalisée sur des ovaires et utérus de souris femelles C57BL6 traitées par PMSG/hCG. Les résultats ont montré la présence de ce site phosphorylé après stimulation ovarienne mais également plus faiblement de façon basale. Ce niveau basal est variable d'une souris à l'autre et corrélé au niveau d'activation de Src et à l'état global de phosphorylation sur tyrosine des protéines, suggérant l'existence d'une régulation physiologique au cours du cycle ovarien des souris.

Le cycle ovarien de la souris comporte quatre phases : le proestrus, l'estrus, le metestrus et le diestrus qui correspondent à des stades différents du développement folliculaire et donc à des sécrétions hormonales différentes. L'analyse du site Y685 au cours du cycle ovarien a été réalisée après avoir suivi deux cycles consécutifs pour chaque souris. Ces cycles sont reconnaissables par analyse en microscopie à contraste de phase de la composition cellulaire de leurs sécrétions vaginales. Par cette méthode,

les ovaires et utérus de souris ont été analysés pour leur contenu en pY685 VE-cadhérine à chaque phase du cycle. Les résultats ont montré de façon reproductible des niveaux différents de phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine selon la phase, celui-ci étant très fort au stade estrus alors qu'il est beaucoup plus faible pour les autres phases, ce qui suggère une régulation de la phosphorylation de la VE-cadhérine pendant le cycle ovarien. Après immunoprécipitation de la protéine à chaque phase du cycle, le même profil de phosphorylation est observé, indiquant un rôle potentiellement important pour les processus physiologiques post-ovulatoires tels que l'angiogénèse qui a lieu dans le corps jaune.

Pour déterminer le rôle de cette modification de Y685 dans la physiologie des vaisseaux, une souris knock-in VE-Y685F a été produite par l'Institut Clinique de la Souris à Strasbourg qui nous a fourni les hétérozygotes. Les souris ont été croisées pour obtenir des homozygotes. Après amplification et recroisement (10 fois), les souris VE-Y685F homozygotes présentent un phénotype viable et expriment la VE-cadhérine aux jonctions intercellulaires comme les souris sauvages. Toutefois, un certain nombre d'anomalies ont été observées à la fois chez les males et chez les femelles nullipares, notamment une hypertrophie utérine avec un œdème prononcé constaté chez 30% des femelles étudiées et particulièrement dans la tranche d'âge comprise entre 4 à 14 mois. Ces résultats indiquent que l'absence de Y685 chez les souris VE-Y685F entraîne une susceptibilité particulière à la perméabilité vasculaire et à la formation d'œdème surtout pendant la période où le cycle ovarien est actif (4 à 14 mois). L'analyse histologique des cornes utérines a montré chez la plupart de ces souris des zones œdémateuses et/ou des zones du myomètre et de l'endomètre très peu denses en cellules dénommées areas of sparse cells (ASC), pouvant atteindre 20% de la densité cellulaire des zones intactes des souris VE-Y685F ou des souris sauvages. De façon intéressante, ces ASC comportent des fibres de collagène très denses autour des vaisseaux sanguins, signe révélateur d'une fibrose de l'endomètre et du myomètre. En effet, la fibrose a souvent été décrite comme marqueur tardif d'un œdème primitif s'étant poursuivi par une forte sécrétion de collagène correspondant à la réparation tissulaire subséquente. Ces résultats suggèrent que les souris femelles VE-Y685F qui ne présentent pas d'œdème mais qui ont des ASC, ont dû précédemment avoir l'utérus œdémateux, ce phénotype pouvant apparaître de façon transitoire selon l'activité hormonale des souris. De plus, ces résultats indiquent que la phosphorylation du site Y685 de la VE-cadhérine pourrait avoir une fonction régulatrice dans la perméabilité vasculaire ou dans la restauration de l'intégrité endothéliale au cours du cycle ovarien. L'analyse des ovaires des souris VE-Y685F a montré qu'environ 30 % d'entre elles (même proportion que pour l'utérus) présentent un œdème ovarien. L'analyse histologique par coloration avec l'hématoxyline-eosine de coupes d'ovaires a montré que l'œdème se situe la plupart du temps dans les follicules. Ce phénotype ressemble fortement à un syndrome d'hyperstimulation ovarienne (OHSS) qui intervient dans la majorité des cas chez des femmes sous traitement hormonal dans la médication de l'infertilité. Comme décrit dans le chapitre IV, l'OHSS est la manifestation d'une forte augmentation de la perméabilité vasculaire dans l'ovaire suite à l'administration de hCG. L'œdème ovarien et utérin chez les souris VE-

Y685F indiquent que la phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine serait impliquée dans le contrôle de la perméabilité vasculaire, pendant la stimulation hormonale ou au cours du cycle.

L'analyse de la perméabilité vasculaire par injection de bleu Evans en intraveineuse a mis en évidence des zones de fuites capillaires du côté interne de la peau des souris VE-Y685F démontrant une fragilité capillaire chez ces souris. Ceci a été confirmé par un test de perméabilité induite par le VEGF en injection intradermique montrant à une plus forte perméabilité vasculaire des souris VE-Y685F comparées aux sauvages. Tous ces résultats pris ensemble montrent que la phosphorylation de la VE-cadhérine sur Y685 accompagne l'effet des inducteurs de perméabilité tels que le VEGF et régule la perméabilité vasculaire in vivo. En plus, la VE-cadhérine reste phosphorylée sur tyrosine au cours du cycle ovarien en dépit de la mutation VE-Y685F.

**II.4 Article 2 : Mouse estrous cycle is a physiological
regulator of VE-cadherin phosphorylation in vivo:
Analysis of VE-Y685F knock-in mice**

*“Cet article est en cours de soumission pour publication à
la revue Journal of Experimental Medicine”*

Mouse estrous cycle is a physiological regulator of VE-cadherin phosphorylation in vivo: Analysis of VE-Y685F knock-in mice

Adama Sidibé^{1,2,3}, Jeremy Razanajatovo^{1,2,3}, Laurie Godart^{1,2,3}, Helena Polena^{1,2,3}, Julie Creuzet^{1,2,3}, Nicolas Chaumontel^{1,2,3}, Soumalamaya Bama^{1,2,3}, Irène Maréchal^{1,2,3}, Hervé Pointu^{1,2,3}, Stephanie Bouillot^{1,2,3}, Philippe Huber^{1,2,3}, Danielle Gulino-Debrac^{1,2,3}, Laurence Bouillet^{1,2,3,4}, Isabelle Vilgrain^{1,2,3}

(1) INSERM, Unité 1036, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, F-38054, France

(2) UJF-Grenoble 1, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, F-38041, France

(3) CEA, DSV/iRTSV, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, F-38054, France

(4) Grenoble University Hospital, Division of Internal Medicine, Grenoble, F-38043, France

Short title: VE-cadherin phosphorylation at Y685 in the control of vascular permeability

Key Words: estrous cycle, VE-cadherin, vascular permeability, knock-in mouse, phosphorylation

The authors disclose no potential conflicts of interest.

Address for correspondence: Isabelle Vilgrain,

INSERM Unité 1036, Institute of Life Sciences Research and Technologies (iRTSV),

Joseph Fourier University, CEA Grenoble,

17, rue des Martyrs 38054 Grenoble Cedex 9. France

E-mail: ivilgrain@cea.fr

ABSTRACT

VE-cadherin, an endothelium-specific cadherin, is phosphorylated at Y685 upon VEGF in HUVEC and is also tyrosine phosphorylated under hormonal stimulation in mouse ovaries and uterus *in vivo*. Herein we investigated VE-cadherin tyrosine phosphorylation at Y685 in ovaries and uterus under hormonal induction and throughout mouse estrous cycle. We further studied for the first time the relevance of VE-cadherin phosphorylation at Y685 *in vivo*. To that purpose, C57Bl/6 mice were hormonally stimulated or classified according to their estrous stages and the VE-cadherin phosphorylation level was analyzed in ovaries and uterus. VE-Y685F mice were produced and the phenotypes analyzed. VE-cadherin was phosphorylated at Y685 in ovary and uterus upon hormonal stimulation. Consistent with this we found VE-cadherin phosphorylated at Y685 in both organs and their extents were regulated throughout estrous cycle. Interestingly, VE-Y685F knock-in females presented edematous uterus and ovaries. VEGF-induced vascular permeability was higher in VE-Y685F mice than C57BL/6 animals. This study provides the first evidences of a potential role for VE-cadherin phosphorylation at Y685 in the regulation of vascular function *in vivo* and we propose the mouse estrous cycle as a new model for studying the mechanism of VE-cadherin and its partner phosphorylation *in vivo*.

INTRODUCTION

Vascular permeability is once a physiological process enabling exchanges of small molecules (nutrients, plasmatic proteins, gases and waste products) or circulating cells between blood-stream and the underlying tissues. Vascular permeability is of major importance for healthy tissue homeostasis, but uncontrolled vascular hyperpermeability is at the basis of several pathologies as ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), hereditary angioedema, cancer and chronic inflammatory diseases including rheumatoid arthritis (McClure, Healy et al. 1994, Scott, Wolfe et al. 2010, Bouillet, Mannic et al. 2011, Janice A. Nagy 2012). Vascular endothelium, then, should tightly regulate the transcellular and paracellular permeability throughout physiological processes. Endothelial cell-cell tight and adherens junctions (AJ) control the paracellular pathways which have been involved in the extravasation of plasma-proteins induced by vascular permeabilizing agents including histamine and vascular permeability factor so called vascular endothelial growth factor (VEGF) (Dejana, Orsenigo et al. 2008, Wallez and Huber 2008). Alteration in AJ function through internalization or cleavage of their components leads to increased permeability.

AJs are mainly formed by a type-I transmembrane protein specifically expressed in endothelial cells and belonging to the cadherin superfamily of adhesion molecules named vascular endothelial (VE) cadherin (Breviario, Caveda et al. 1995, Gory, Vernet et al. 1999, Wallez, Vilgrain et al. 2006). VE-cadherin is the major cell-to-cell adhesion molecule located at AJs and necessary for endothelium integrity (Vittet, Buchou et al. 1997, Corada, Mariotti et al. 1999). It works by establishing homophilic interactions with the extracellular domains of VE-cadherin molecules, forming thereby a kind of glue between endothelial cells. Corada et al demonstrated the necessity of functioning VE-cadherin at AJs by targeting the molecule with a blocking antibody in vivo which led to hemorrhage in many organs and increased vascular permeability (Corada, Mariotti et al. 1999). Angiogenesis, the formation of new blood vessels from existing ones, is impaired in VE-cadherin deficient mice leading to embryonic lethality at mid-gestation demonstrating a pivotal role of VE-cadherin during embryonic development (Gory-Faure, Prandini et al. 1999). AJs disruption caused by VE-cadherin cleavage or internalization have been proposed to increase vascular permeability subsequent to endothelial cell treatments with angiogenic and inflammatory factors including VEGF, histamine and TNF α (Herren, Levkau et al. 1998, Andriopoulou, Navarro et al. 1999, Gavard and Gutkind 2006, Sidibé, Mannic et al. 2012). All these cytokines can provoke VE-cadherin complex phosphorylation at tyrosine or serine residues and then accompany the endothelial permeability in vitro.

Few studies investigated VE-cadherin tyrosine phosphorylation in vivo. Weis et al observed the occurrence of Flk/VE-cadherin complex phosphorylation on tyrosine during Ischemia, vascular permeability and edema resulting from myocardial infarction (Weis, Shintani et al. 2004). Interestingly we observed VE-cadherin tyrosine phosphorylation in ovaries and uterus, normal sites of the remaining physiological angiogenesis in adults (Lambeng, Wallez et al. 2005). In addition, hormonal stimulation with pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and human chorionic gonadotropin (hCG) dramati-

cally enhanced the global phosphorylation level of VE-cadherin but the specific tyrosine residues implicated remain unknown.

Different VE-cadherin tyrosine phosphorylation sites have been identified and found phosphorylated under specific inflammatory or angiogenic conditions (Allingham, van Buul et al. 2007, Wallez, Cand et al. 2007, Turowski, Martinelli et al. 2008). As an example, leukocyte emigration is associated with VE-cadherin phosphorylation at Y645, Y658, Y731 and Y733 (Turowski, Martinelli et al. 2008). Baumeister et al reported a regulatory role for phosphorylated Y685 of VE-cadherin by serving as a docking site to c-terminal Src kinase (CSK) and then participates in the inhibition of endothelial cell proliferation (Baumeister, Funke et al. 2005). Furthermore, Src kinase has a higher affinity for Y685 and phosphorylates preferentially this tyrosine when endothelial cells are stimulated with VEGF (Wallez, Cand et al. 2007), sustaining the idea of a role for Y685 in the regulation of VEGF-dependent processes in vivo. Nevertheless the relevance of VE-cadherin phosphorylation at Y685 in vivo and its implication in AJ opening or cell proliferation remains elusive and the main limitation of the hypotheses drawn from the above data is that they were obtained by the use of different types of cultured cells in vitro. Consequently the impact of VE-cadherin phosphorylation has to be addressed in vivo.

In this study we investigated whether VE-cadherin tyrosine phosphorylation occurring in ovaries and uterus under hormonal stimulation involves Y685 residue. As ovaries and uterus are the only organs subjected to cyclic functioning due to episodic secretion of reproductive hormones and angiogenic factors in adult mice, we addressed VE-cadherin tyrosine phosphorylation throughout mouse estrous cycle in order to identify the phosphorylated sites. We further studied for the first time the importance of VE-cadherin Y685 phosphorylation in vivo by generating and analyzing the phenotypes of knock-in mice carrying a tyrosine-to-phenylalanine point mutation of VE-cadherin Y685 (VE-Y685F).

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement for animal experimentations: All procedures were approved by ComEth ethical committee. All protocols in this study were conducted in strict accordance with the French guidelines for the care and use of laboratory animals.

Construction of VE-Y685F transgenic mice: VE-Y685F transgenic mice were produced by the Institut Clinique de la Souris (Strasbourg, France). Briefly, the codon encoding VE-cadherin Y685 is located in VE-cadherin exon 12 as indicated in Figure S1A. Two PCR products were produced, one of 3.6 kb spanning from intron 11 to intron 12 (left arm), and one of 2.1 kb in intron 12 (right arm). Mutation from TTC (Tyr/Y) to TAC (Phe/F) was performed with the Quick Change kit from Stratagene. Both arms were assembled with a neomycin resistance cassette (PGK-Neo) containing a LoxP site at each end (Fig. S1A). The resulting vector was electroporated in 129SV ES cells and clones were selected for neomycin resistance. Colonies were screened by PCR. Five colonies were found positive out of 372 screened (not shown). Homologous recombination was confirmed by Southern blot. Recombination of the 5'-arm was tested on BglII-digests, and that of the 3'-arm on XbaI-digests. Blots

were hybridized with a Neo probe, as illustrated in Figure S1B. Recombination was also confirmed by Southern blot on SexA1 digests with a 5'-external probe (not shown). A recombinant clone was used to produce heterozygous and then homozygous mice by conventional technology and breeding. Homozygotes were mated with mice expressing the Cre recombinase under a CMV promoter (Tg-CMV-Cre) and recombination was selected on pups using a PCR strategy (not shown). The resulting transgenic mice (VE-Y685F) were backcrossed 10 times onto C57BL/6 background.

Reagents: PMSG and hCG both were from Sigma-Aldrich. Commercially available antibodies were purchased from different sources: mouse monoclonal antibody specific for VE-cadherin cytoplasmic domain (Santa Cruz Biotechnology), rat monoclonal antibody anti-CD144 (11D.4.1 from BD transduction), mouse monoclonal anti-phosphotyrosine 4G10 (Millipore), mouse polyclonal anti-βactin (Sigma Aldrich), rabbit polyclonal anti phospho-Src(Y418) (Invitrogen), rabbit polyclonal anti c-Src (Santa Cruz Biotechnology). Rabbit polyclonal anti-phospho-VE-cadherin(Y685) has been produced and purified in our laboratory (results of the antibody characterization are provided in supplementary). Enhanced chemiluminescence detection reagents were purchased from Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France). Nitrocellulose was obtained from Schleicher and Schuell (Ecqueville, France). The microbicinchoninic acid protein assay reagent kit was from Fischer-Scientific (France). ACCUSTAIN™ TRICHROME STAIN staining kit, Harris hematoxylin and eosin were all purchased from Sigma Aldrich

Buffers

Buffer A was : 20 mM Tris/acetate (pH 7.0), 0.27 M sucrose, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamidine, 4 µg/ml leupeptin and 1 µg/ml pepstatin A.

Buffer B was: 10 mM Tris/HCl (pH 7.4), BSA 0.1%, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamidine, 4 µg/ml leupeptin and 1 µg/ml pepstatin A.

Buffer C was: 10 mM Tris/HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % (v/v) Triton X-100 and 0.5 % (v/v) Nonidet P-40, BSA 0.1%, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamidine, 4 µg/ml leupeptin and 1 µg/ml pepstatin A.

Sodium peroxovanadate solution: A stock solution of peroxovanadate at 50 mM was prepared by mixing equal volumes of 0.1 M sodium orthovanadate and 0.2 M H₂O₂. After incubation at room temperature for 20 min, the solution was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) to a final concentration of 5 mM before use. The final concentration used for cell treatment was 5 µM.

Hormonal stimulation: Mice were given an intraperitoneal injection of 10 IU of PMSG in 0.75 mL of 0.9% NaCl on day 1, followed by 5 IU of hCG in 0.4 mL of 0.9% NaCl, 48 hours later (Lambeng, Wallez et al. 2005). Animals were euthanized 6 hours after second injection by cervical dislocation after peroxovanadate administration.

Estrous cycle stage examination: Estrous cycle stages were determined as previously described (Calignoni 2009). Briefly, vaginal secretions (wet smear) of post-pubertal female mice (at least n=5 per

group) were collected in phosphate buffered saline with fine tip pipets (1 mm diameter). The vaginal wet smears were placed on glass slide and observed by phase contrast microscopy with x10 or x20 objectives to characterize cell types and to determine their proportions. Mice estrous cycle can be divided into four phases which are defined according to the proportion in three cell types (round-shaped nucleated epithelial cells, cornified squamous epithelial cells and leukocytes). Thus at proestrus, nucleated epithelial cells are predominant whereas estrus is distinctively composed of cornified squamous epithelial cells, metestrus is characterized by a mix the three cell types and diestrus consists predominantly of leukocytes. The full estrous cycle in mice spans 4 to 5 days. In this study we used cycling mice in different estrous stages. At least two consecutive baseline cycles were recorded prior to manipulation. Mice were given an i.p injection of 1 mM of peroxovanadate and deeply anesthetized 5 minutes later with sodium pentobarbital (50 mg/kg) for blood collection by heart puncture. Ovaries and uterus were collected for biochemical analyses.

Tissues extractions: Tissue extracts were prepared from mouse organs by lysing and soni-cating them in buffer A according to the ratio 10:1 (ml buffer A: g of organ). Lysates were cleared by centrifugation at 14000 rpm for 30 min, then protein content was measured using the micro-bicinchoninic acid protein assay and used in immunoblotting or immunoprecipitation experiments.

Immunoprecipitation: Various tissue extracts (500 µg) containing IgG were cleared with protein G Sepharose beads for 30 min at 4°C and the supernatant was incubated with 2 µg of the polyclonal antibody to VE-cadherin in 500 µl of buffer B for 1 h at 4°C. Immunoprecipitations were performed with protein G–Sepharose beads and fractions were collected for 45 min at 4°C. The fractions were centrifuged for 5 min at 4°C and the immunoprecipitates were washed five times with buffer C. Samples were eluted by boiling in a 1:5 ratio (v/v) with Laemmli buffer containing a final concentration of 2.5% (v/v) β-mercaptoethanol, and subjected to SDS-PAGE (12% Acrylamide, 0.2% bis-acrylamide).

Western blotting: Protein (40 µg) from the endothelial cell extracts was analyzed by SDS-PAGE (12 % Acrylamide, 0.2% bis-acrylamide). Proteins were then transferred from the gel to nitrocellulose for 1 h and the residual binding sites were blocked by incubating the filters for 1 h in PBS containing 0.05 % (v/v) Tween 20 and 5 % (w/v) non-fat milk. The blots were subsequently incubated for 1 h with antibodies to VE-cadherin, or phosphotyrosine (1 µg/ml). After being washed, the blots were incubated for 1 h with horseradish- peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG diluted in PBS containing 0.05 % (v/v) Tween 20. Immunoreactive proteins were visualized by chemiluminescence.

Histology and immunofluorescence: Organs were fixed with 4% paraformaldehyde over-night, paraffin-embedded and 5 µm cross-sections made by the use microtome. The tissue sections were deparaffinized, rehydrated and stained either with hematoxylin and eosin or with Masson's trichrome stain. The stained sections were analyzed by light microscopy.

For vessel immunostaining, organs were either frozen in nitrogen liquid or paraffin embedded and cross sectioned. The tissue sections were stained with antibodies raised against mouse VE-cadherin or

CD31/PECAM and specific secondary antibodies were diluted in 2% BSA and used as indicated in figure legends.

Vascular permeability assessment: To evaluate the basic vascular permeability, the experiments were performed as previously described with slight modifications (Garcia, Vogel et al. 2011). Briefly, mice (at least n=5 per group) were injected in the tail vein with 1 ml/kg 3% Evans Blue (EB) diluted in PBS. After 30 min, animals were sacrificed and excised skin samples were incubated for 3–4 days in formamide at 4°C. The quantification of blue dye incorporated into the tissue was determined by using OD 620 nm with a standard curve of EB. In Miles assay, animals were injected intradermally into shaved area with VEGF after EB injection and sacrificed 30 min later.

Data analysis: Unless stated elsewhere, Mann-Whitney rank test was used to determine the significance of the difference in uterus sizes and in extracted EB quantities. The results highlighting p-values <0.05 were considered significantly different. Six mice per group were used in each set of experiments. The experiments were performed at least three times under identical or similar conditions with comparable results.

RESULTS

VE-cadherin was tyrosine phosphorylation at site Y685 in hormonally-stimulated and non-stimulated mouse ovaries and uterus

We investigated whether VE-cadherin was specifically phosphorylated at Y685 in hormonally-stimulated mouse uterus and ovaries. Therefore hormones-treated C57BL/6 females were obtained by the administration of PMSG and hCG as previously described (Lambeng, Wallez et al. 2005) and VE-cadherin Y685 phosphorylation levels in ovaries and uterus were examined with our newly developed anti-phospho-Y685 VE-cadherin antibody (whose characterization data are presented in Supplementary) and compared to those of non-treated mice. The VE-cadherin phospho-Y685 (pY685) signal was detected in ovaries and uterus from both treated and non-treated females but pY685 level was increased after hormonal treatment (Fig 1A, B). Interestingly we noticed that untreated females presented various levels of pY685 VE-cadherin that were correlated with different levels of tyrosine phosphorylated proteins including Src active form (Src-Y418) (Fig 1C, D) suggesting a physiological event inducing several protein tyrosine phosphorylation ovaries and uterus. The analysis of uteri from numerous non-treated C57BL/6 females highlighted clear differences in pY685 levels (Fig 1E). These results demonstrate that the hormonal induction of ovarian maturation leads to VE-cadherin tyrosine phosphorylation at Y685 correlated with the activation of Src kinase *in vivo*. As reproductive organs are known to undergo cyclic VEGF dependent -vascular remodeling and angiogenesis (Engerman, Pfaffenbach et al. 1967, Ferrara, Chen et al. 1998), the observed variations in VE-cadherin pY685 levels might reflect differences in hormonal and angiogenic status of mouse ovary and uterus.

VE-cadherin Y685 phosphorylation in uterus and ovaries is regulated throughout estrous cycle in C57BL/6 Several bodies of evidence demonstrated that gonadotropin-induced ovarian angiogenesis

was dependent on VEGF/Flk1 pathways (Ferrara, Chen et al. 1998, Fraser, Dickson et al. 2000, Zimmermann, Hartman et al. 2003). VEGF stimulation induces the phosphorylation of VE-cadherin Y685 downstream of VEGF/Flk1 signaling in vitro (Wallez, Cand et al. 2007). Previously in our lab, it was found that VE-cadherin is highly phosphorylated at tyrosine residues in ovaries and uterus in PMSG/hCG-treated mice (Lambeng, Wallez et al. 2005). Hence, we investigated whether VE-cadherin was specifically phosphorylated at Y685 in hormonally-stimulated uterus and ovaries. Therefore hormones-treated C57BL/6 females were obtained by the administration of PMSG and hCG as previously described and VE-cadherin Y685 phosphorylation levels in ovaries and uterus were examined and compared to those of non-treated mice. The VE-cadherin phospho-Y685 (pY685) signal was detected in the ovaries and uterus from both treated and non-treated females but pY685 level was significantly increased after hormonal treatment (fig.2A, B). Nevertheless we noticed that non-treated females presented various levels of pY685 VE-cadherin that were correlated to the profile of global phosphotyrosine and Src active form (Src-Y418) (fig.2C, D). The analysis of uteri from numerous non-treated C57BL/6 females highlighted clear differences in pY685 levels (fig.2E). These results demonstrate that the hormonal induction of ovarian maturation leads to VE-cadherin tyrosine phosphorylation at Y685 correlated with the activation of Src kinase in vivo. Moreover the variations in VE-cadherin pY685 levels in non-treated mice suggest different states of physiological VE-cadherin phosphorylation according to the hormonal and angiogenic status of these reproductive organs.

VE-cadherin Y685 phosphorylation in uterus and ovaries is regulated throughout estrous cycle in C57BL/6

To examine whether mouse estrous cycle could account for the various levels of pY685 VE-cadherin in untreated mouse ovaries and uterus, C57BL/6 females were then followed during at least two full estrous cycles and sorted according to their estrous cycle phases (n=5 per phase). Rodent estrous cycle is divided into four phases termed proestrus, estrus, metestrus and diestrus (Caligioni 2009). Cell content analysis of mice vaginal smears was performed and the animals sacrificed at one of the four stages (Fig 2A, B). Ovaries and uterus of the sorted mice showed the presence of VE-cadherin tyrosine phosphorylation with various extents according to the estrous cycle stage as analyzed with anti-phosphotyrosine antibody (anti-pTyr) after VE-cadherin immunoprecipitation (Fig 2C). This extent was lowest at proestrus, increased and strongly reached a peak at estrus. At metestrus VE-cadherin pY685 signal declined and remained low at diestrus (Fig 2D). The same pattern of VE-cadherin tyrosine phosphorylation was noticeable in both organs but the level was higher in uterus than ovaries. Interestingly, the same profile was found in both organs for Src kinase activation status. Indeed, Src kinase was phosphorylated at Y418 and this phosphorylation reached a peak at the estrus stage while it was low at the other stages (Fig 2E). Furthermore, we examined VE-cadherin phosphorylation specifically at Y685 residue throughout the estrous cycle. VE-cadherin was highly phosphorylated at Y685 at estrus phase in uterus and ovaries (Fig 2F). The levels of this specific phosphorylation followed the same profile

than VE-cadherin global phospho-tyrosine status during estrous cycle indicating a hormonal regulation of tyrosine phosphorylation processes. Consistent with these data, the analysis of the whole protein phosphorylation states throughout estrous cycle with anti-pTyr revealed a dramatic increase in phosphotyrosine-containing proteins ranging from 40 kDa up to 200 kDa in uterus and ovaries (Fig 2G). Altogether, these results indicate a time-dependent correlation between tyrosine phosphorylation and mouse estrous cycle.

Because angiogenesis in ovarian follicle and corpus luteum starts at the estrus stage (Fig 3A), we analyzed ovarian vasculature in tissue sections by immunostaining with PECAM and VE-cadherin antibodies. The results presented in Figure 3B, showed that at proestrus and after ovulation, peripheral vessels are surrounding the follicles, while at metestrus, the blood vessels density was very high in the central zone of corpus luteum. As pY685 VE-cadherin was the highest at the estrus, it might be suggested that VE-cadherin phosphorylation at Y685 is involved in the angiogenic process leading to blood vessels invasion observed at estrus phase which would be consistent with its previously described role in the regulation of endothelial cell proliferation.

Altogether these results demonstrate that VE-cadherin is tyrosine phosphorylated at Y685 according to physiological hormonal variations in ovaries and uterus suggesting the involvement of this site phosphorylation in angiogenesis process along estrous cycle.

VE-Y685F knock-in mice

The above data in vivo, in addition to our previous results gathered in vitro in VEGF-stimulated HUVEC, strongly suggested an important physiological relevance of this specific VE-cadherin phosphorylation at Y685 site in vascular physiology. To determine the potential role of the tyrosine 685 in VE-cadherin functions in vivo, we thus produced VE-Y685F knock-in mice as described in Methods. As presented in Figure S1C, PCR product of VE-Y685F allele was higher in size (~300 bp) compared with WT one (~200 bp) and allowed to differentiate knock-in mice from WT animals. The sequence within exon 12 of VE-cadherin gene, spanning the codons corresponding to Phe685 or Tyr685 in VE-Y685F or WT mice respectively, showed an effective VE-Y685F mutation (not shown). To obtain homozygous mice, VE-Y685F mice were ten times backcrossed into C57Bl/6 background and heterozygous mice were intercrossed to obtain homozygous animals. Their fecundity and pup genotypes were also investigated to determine the viability of homozygous pups in litters. The fecundity of heterozygous knock-in mice was similar to that of wild-type animals and the ratios of the three genotypes were concordant with a mendelian allele distribution (fig.4A). The homozygous mice were viable and VE-cadherin protein was detected in all organs including lung, uterus, kidney and liver, exhibiting the same apparent molecular weight as WT (125 kDa), (Fig 4B, C). Because lung is a highly vascularized organ, VE-cadherin localization in vessels from KI mouse was examined on lung tissue sections by immunostaining with anti-PECAM and anti-VE-cadherin antibodies. As shown in Figure 4F, VE-cadherin co-localized with PECAM in large vessels and was expressed at endothelial cell-cell junc-

tions (Fig 4D). The same VE-cadherin expression and co-localization with PECAM were observed in capillaries (not shown). Altogether, these data demonstrate that VE-Y685F mutation in VE-cadherin did not impair its expression in endothelial cells in blood vessels and capillaries.

We next analyzed the fertility of the VE-Y685F mice through comparing the number of their litters with that of wild-type animals. Over the litters of 6 mice analyzed in each group, the number of knock-in mice litter ($\sim 8 \pm 3$) was not significantly different from that of WT mice ($\sim 8 \pm 2$) (Table S1). The gender proportions were around 0.5 of males and 0.5 of females then followed the mendelian law. All together these data demonstrate homozygous VE-Y685F mice are viable and fertile as normally as the wild-type animals and present VE-cadherin at endothelial cell junctions.

Nulliparous adult VE-Y685F females exhibited abnormally edematous and fibrotic uterus

In macroscopic organ analysis, the most surprising difference in VE-Y685F mouse was in uterus from female mice. Indeed, uterus of VE-Y685F mice were larger than WT and extremely edematous, with a diameter significantly higher (VE-Y685F mice: $n=18$, median= 4 mm; WT mice: $n=15$, median= 2.4 mm ($p=0.032$, Mann-Whitney rank test). (Fig 5A-D). This phenotype was observed in about 30% of the homozygous knock-in females. Conversely edematous or hypertrophic uteri were mostly observable within 4 to 14 months old VE-Y685F female mice, after having sorted the animals according to their age (Fig 5E). The histological analysis of uteri from VE-Y685F female mice exhibiting enlarge phenotype were further investigated using Hematoxylin and eosin (HE) staining of longitudinal sections. A strong dis-organization in the inner circular myometrium and the endometrium was easily detected in VE-Y685F mice (Fig 5F, (b) and (e)) and/or highly edematous uterine glands when compared to WT (Fig 5F, (c) and (g)). The striking observation was the presence of numerous areas with sparse cells (ASC) in the endometrium and myometrium (Fig 6A, black arrow). Picrosirius red staining demonstrated that these ASC contained a high level of collagen fibers. The cellular density in these areas was determined by nuclei cell counts and the results were compared to the cellular density of normal area in VE-Y685F myometrium and endometrium as well as to those in WT females. The cell number in ASC was decreased down to about 30% of normal areas either in myometrium and endometrium (Fig 6B). Masson's trichrome and HE staining of uterus longitudinal sections revealed a dramatic accumulation of collagen fibers just around blood vessels and capillaries within small ASC in VE-Y685F uterus (Fig 6C). Consistent with this, VE-cadherin staining of uterus sections to analyze the vasculature, within increasing sizes of ASC, revealed a decrease in the blood vessel density associated to a drastic disappearance of the surrounding stromal cells (Fig 7). These latter results suggested that the function of many blood vessels in supplying nutrients and gases might be altered along with ASC formation leading to stromal cell death. Altogether, the above observations indicated that VE-Y685F mutation may favor an increase in vascular permeability and blood vessel leakiness leading to uterus edema and fibrogenesis, subsequent to tissue reparation processes. These exacerbated pheno-

types suggested the involvement of VE-cadherin phosphorylation at Y685 in the regulation processes of vascular permeability or in the recovery of endothelial junction integrity in uterus during adulthood.

Ovarian hyperstimulation syndrome-like phenotype in VE-Y685F adult females

Ovary is another female reproductive organ which is subjected to repeated changes along the estrous cycle and subjected to vascular endothelial remodeling during ovarian follicle maturation under VEGF/Flk-1 pathway control (Ferrara, Chen et al. 1998). Consistent with that, we found that over 20 VE-Y685F mice analyzed, 7 (~30%) exhibited edematous ovaries as it was observed by in situ examination (Fig 8A). The histological staining with HE of sections from ovary showed edematous follicles in VE-Y685F mouse ovaries compared to those of wild-type animals (Fig 8B). Interestingly this ovarian phenotype in VE-Y685F mice looks like the ovarian hyperstimulation syndrome observed in women (OHSS), a complication of some forms of fertility medication. Indeed, the injection of human chorionic gonadotropin (hCG) is used for inducing final oocyte maturation and/or triggering oocyte release. After multiple doses of hCG, the risk of OHSS increases. In mild forms, the ovaries are enlarged (5–12 cm in women) and there may be additional accumulation of ascites in abdominal cavity. The central feature of clinically significant OHSS is the development of vascular hyperpermeability and the resulting shift of fluids (McClure, Leya et al. 1992). These results sustain the hypothesis of the involvement of VE-cadherin phosphorylation at Y685 in vascular permeability control processes and indicate moreover that the alteration of VE-cadherin function could participate in OHSS pathophysiology.

VE-cadherin phosphorylation at Y685 controls vascular permeability in vivo

In the light of our above data, we hypothesized that VE-cadherin specific phosphorylation at Y685 may participate in the regulation processes of vascular permeability in vivo. To address this issue, we investigated the mice basal vascular permeability in the skin of VE-Y685F male mice through assessing Evans Blue (EB) leakage. Knock-in mice presented spontaneous blue spots, indicated by arrowheads, in the inner side of the skin around capillaries corresponding to leaky capillaries in absence of any permeability increasing agent (Fig 9A). Numerous VE-Y685F knock-in mice exhibited at least five blue spots while wild-type mice did not presented any blue spot ($p=0.0361$) suggesting that VE-Y685F mutation may render capillaries more often leaky under permeability conditions (Fig 9B). We then examined VE-Y685F male mice sensitivity to VEGF-induced vascular permeability by injecting them intradermally with 100 ng of VEGF after having been i.v injected with EB. VEGF-induced EB extravasation was higher in knock-in mice as shown in Figure 9C. Vascular permeability was further quantified through assaying EB incorporated into the skins by extracting it with formamide. The results showed a higher incorporation of EB upon VEGF dermal stimulation in VE-Y685F mouse skin compared to wild-type animals (Fig 9D). Altogether these results demonstrate that VE-Y685F mice

are more sensitive to vascular permeability than WT animals demonstrating that VE-cadherin tyrosine phosphorylation at Y685 participates in the regulation processes of vascular permeability.

VE-cadherin remains tyrosine phosphorylated in VE-Y685F ovaries and uterus

To investigate whether VE-Y685F sensitivity to vascular permeability could still involve VE-cadherin tyrosine phosphorylation, we analyzed VE-Y685F female ovaries and uterus during estrous cycle for VE-cadherin phosphorylation status. Expectedly no signal was detectable with anti-pY685 antibody whatever the estrous cycle stages in VE-Y685F animals whereas a dynamic profile were found in wild-type mice concordantly with our above data (Fig 10A). Nevertheless VE-cadherin remained tyrosine phosphorylated at estrus phase as revealed with a phospho-tyrosine staining after VE-cadherin immunoprecipitation (Fig 10B). All these data indicated that in VE-Y685F mice, VE-cadherin remains phosphorylated along estrous cycle.

DISCUSSION

VE-cadherin tyrosine phosphorylation at specific sites has been extensively reported in cultured cell systems under conditions as particular as inducing endothelial cell proliferation, leukocyte extravasation, vascular permeability induced by angiogenic or inflammatory agents (Baumeister, Funke et al. 2005, Wallez, Cand et al. 2007, Turowski, Martinelli et al. 2008). Though some studies also investigated the occurrence of VE-cadherin tyrosine phosphorylation in vivo by the mean of induced processes, its phosphorylation at specific sites remains to be addressed in vivo (Weis, Shintani et al. 2004, Lambeng, Wallez et al. 2005). In the lab, we previously reported VE-cadherin tyrosine phosphorylation in ovary and uterus upon hormonal stimulation (Lambeng, Wallez et al. 2005). Herein, we report VE-cadherin phosphorylation at Y685 upon hormonal stimulation in vivo in uterus and ovaries. pY685 was correlated with the level of the active form of Src (Src-pY418) indicating the involvement of Src kinase in physiological modulation of VE-cadherin phosphorylation at Y685 in vivo as previously demonstrated in vitro (Wallez, Cand et al. 2007). Unexpectedly, pY685 levels in untreated mice were highly variable. This variation was due to physiological changes in mice hormonal status as reproductive organs undergo substantial remodeling of the vasculatures and their functions throughout estrous cycle (Reynolds, Killilea et al. 1992, Gómez, Simón et al. 2002). Consistent with this and of major interest, herein we report for the first time a dynamic pattern of VE-cadherin tyrosine phosphorylation depending on the mouse stage in estrous cycle. This phosphorylation level was highest at the estrus stage, the phase just after the ovulation suggesting a role for this VE-cadherin tyrosine phosphorylation in early post-ovulatory events including angiogenesis in uterus and ovary. In addition, we found VE-cadherin highly phosphorylated at Y685 in ovary and uterus at the estrus phase. We previously have shown VEGF to induce VE-cadherin phosphorylation preferentially at Y685 mediated by Src kinase activity in HUVEC (Wallez, Cand et al. 2007). VEGF up-regulatory effect on VE-cadherin tyrosine phosphorylation is now widely established in vitro. About ten years ago, Ferrara et al reported

VEGF as being essential for angiogenesis in corpus luteum (Ferrara, Chen et al. 1998). Since, others confirmed the necessity of VEGF and VEGFR2 for correct angiogenesis in ovary and uterus, emphasizing the importance of VEGF/Flk-1 pathway in ovarian angiogenesis and vascular permeability (Fraser, Dickson et al. 2000, Zimmermann, Hartman et al. 2003, Fan, Krieg et al. 2012). Therefore, VE-cadherin tyrosine phosphorylation throughout estrous cycle might be mediated by VEGF in uterus and ovary. Moreover, cycling reproductive hormones have been reported to up-regulate VEGF expression. Indeed, several lines of evidences have demonstrated estrogen effect on the increase in VEGF expression in various contexts (Buteau-Lozano, Ancelin et al. 2002, Hervé, Meduri et al. 2006, Kazi and Koos 2007, Arany, Foo et al. 2008). VEGF gene contains two estrogen response elements (EREs) that can mediate estrogen-induced VEGF expression and uterine vascular permeability (Chakraborty, Das et al. 1995, Hyder, Nawaz et al. 2000). Many studies have reported controversial effects of progesterone on VEGF expression. Nevertheless, angiogenesis and associated vascular permeability are necessary for preparing the uterine endometrium for implantation and successful reproduction (Folkman 1995). Strikingly, estrogen reaches a peak at proestrus and other hormones including follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) or progesterone have their peaks during ovulation, just at the beginning of the estrus phase (Butcher, Collins et al. 1974, Staley and Scharfman 2005). Consistent with all these data, we found VE-cadherin to get its highest tyrosine phosphorylation state at estrus stage, supporting thereby the idea of an early post-ovulatory effect of VEGF on VE-cadherin tyrosine phosphorylation. Whether steroid hormone can induce VE-cadherin tyrosine phosphorylation in a direct manner or through other angiogenic factors and then be accountable for this along estrous cycle, have to be extensively investigated. Our findings open a new era in studying VE-cadherin phosphorylation in vivo, hence we report mouse estrous cycle as a new tool to be used as a dynamic model for exploring the relevance of VE-cadherin specific phosphorylation at tyrosine residues and the influences of endogenous or exogenous factors on this event.

The particular pattern of VE-cadherin phosphorylation at Y685 raises the question about its role(s) in reproductive organ physiology throughout estrous cycle. Few studies have been conducted in order to determine the implication of this specific phosphorylation of VE-cadherin in vitro. VE-cadherin pY685 has been reported in an in vitro study to participate in the inhibition process of endothelial cell proliferation by serving as a docking site for CSK which in turn phosphorylate Src at Y529 to inhibit its kinase activity (Baumeister, Funke et al. 2005). However, any study has been conducted to unveil the relevance of VE-cadherin phosphorylation at Y685 in vascular physiology in vivo. Given the strong evidence of Src-mediated VE-cadherin preferential phosphorylation at Y685 in vitro (Wallez, Cand et al. 2007) and the high level of pY685 we found in hormonal stimulated organs or throughout mouse estrous cycle, we investigated its relevance in vivo by generating a VE-Y685F knock-in mouse. The strategy used in the knock-in mouse generation process permitted us to easily distinguish VE-Y685F from wild-type mice by genotyping as we were able to produce a larger PCR product in VE-Y685F (~300 bp) than in WT (~200 bp). In this study we demonstrated that VE-cadherin phosphoryla-

tion at Y685 is important for controlling physiological vascular permeability events taking place in various organs including skin, uterus and ovary.

Several studies reported VE-cadherin phosphorylation along with induced endothelium permeability *in vitro* (Andriopoulou, Navarro et al. 1999, Nawroth, Poell et al. 2002, Potter, Barbero et al. 2005, Angelini, Hyun et al. 2006, Wallez, Cand et al. 2007). A recent work showed that Src-induced VE-cadherin tyrosine phosphorylation was not sufficient to provoke vascular permeability; hence the effective role of specific tyrosine phosphorylation in the protein arose (Adam, Sharenko et al. 2010). Our data show that VE-Y685F mice are more sensitive to vascular permeability induced by VEGF local administration indicating that VE-cadherin phosphorylation at Y685 seems to accompany vascular permeability and then might favor a rapid restoration of endothelial junction integrity. Thus VE-Y685F knock-in mouse is more susceptible to develop edema and fibrosis in uterus as demonstrated in this study. The fibrotic zones identified as areas with sparse cells (ASC) in VE-Y685F uterus exhibited low density of muscle cells or stromal cells, indicating a poor nutrient and gas supply into the underlying tissue. Edema and fibrosis appearance have long been identified as hallmarks of initial increased vascular permeability (Slauson, Hahn et al. 1976, Brown, Dvorak et al. 1989). Indeed, vascular permeability induced by pathophysiological events provokes an accumulation of edema and tissue damage, followed by fibrosis due to the damaged tissue remodeling (Nagy, Brown et al. 1989, Beller, Maekawa et al. 2004, Weis, Shintani et al. 2004). However, VE-Y685F females are fertile and have the same pup number in litters than wild-type animals, indicating that the observed phenotype in VE-Y685F mice might be overcome during pregnancy.

Otherwise, VE-Y685F females also presented edematous ovaries which resembled strongly the OHSS. The OHSS most often occurs as an iatrogenic complication of ovarian-stimulation treatments for *in vitro* fertilization characterized by a massive ovarian enlargement due to vascular permeability (the incidence of severe forms ranges from 0.5 to 5 percent (McClure, Leya et al. 1992, Kaiser 2003). Some familial cases of spontaneous OHSS have been reported, however, the major cause of this complication is due to hCG treatment for triggering oocyte release and to increase the successfulness of pregnancy (McClure, Leya et al. 1992, Vasseur, Rodien et al. 2003). Interestingly, we demonstrated in this study that mouse hormonal stimulation with PMSG/hCG induced a strong increase in VE-cadherin phosphorylation at Y685 suggesting a relevance of this specific tyrosine phosphorylation in regulating vascular permeability induced by the hormonal treatment. Moreover, this is consistent with the appearance of spontaneous OHSS-like phenotype in VE-Y685F females indicating that a perturbation in VE-cadherin function could lead to this syndrome. VEGF has been reported as the mediator in hCG-treated women that would exacerbate vascular permeability and then lead to OHSS development (McClure, Healy et al. 1994). Thus, it is likely that the OHSS-like phenotype in VE-Y685F mice might be mediated by VEGF/Flk1 pathway. Spontaneous OHSS-like phenotype as well as others observed in VE-Y685F mice did not have a complete penetrance indicating an inter-individual difference

in susceptibility. It can also be explained by a dynamic occurrence of the phenotype in some periods during the mouse life.

Consistent with these phenotypes, we found VE-Y685F mice to present some spontaneously leaky vessels in the inner side of the skin and were more sensitive to VEGF-induced vascular permeability in vivo demonstrating the implication of VE-cadherin phosphorylation at Y685 in the regulation process of vascular permeability. This is consistent with the fact that VE-cadherin tyrosine phosphorylation has been reported not to be sufficient to induce endothelial permeability in vitro letting the possibility of other role for the phosphorylation (Adam, Sharenko et al. 2010). However VE-cadherin phosphorylation at Y685 occurs under VEGF stimulation and then accompanies VEGF-induced endothelial permeability. Our data show VE-cadherin phosphorylation at Y685 upon VEGF treatment and regulate the extent of vascular permeability in vivo. Interestingly VE-cadherin remained tyrosine phosphorylated at other tyrosine residues in VE-Y685F mice throughout estrous cycle. We then could not exclude the possibility that other phosphorylated tyrosine could favor vascular permeability in VE-Y685F.

CONCLUSION

In this study we demonstrated VE-cadherin tyrosine phosphorylation at Y685 in mouse ovary and uterus upon hormonal stimulation. For the first time we reports a physiological dynamic regulation of VE-cadherin tyrosine phosphorylation throughout mouse estrous cycle and then proposes estrous cycle as a new model for studying VE-cadherin and its partner phosphorylation within physiological conditions in vivo. Of major interest we found 30% of VE-Y685F knock-in mice to develop spontaneously an OHSS-like phenotype putting light on the possibility of VE-cadherin function alteration in this syndrome and above all highlighting a potential interest for this new mouse strain in studying vascular endothelial junction remodeling in the syndrome. We did not seize the endogenous or exogenous events triggering OHSS in VE-Y685F females yet. Identifying these parameters would permit the use of VE-Y685F mouse as a new animal model of spontaneous OHSS and then would be of great importance in pharmacological studies for improving the in vitro fertilization.

ACKNOWLEDGEMENT

Thanks to the CEA animal facility technicians. The project was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Commissariat à l'Energie atomique et Alternative, the Institut National du Cancer (INCa) and Commissariat à l'Energie atomiques et Alternatives (CEA). Adama Sidibé received grants from Fondation Arthritis Courtin. Helena Polena received a grant from Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC)

REFERENCES

- Adam, A. P., A. L. Sharenko, K. Pumiglia and P. A. Vincent (2010). "Src-induced tyrosine phosphorylation of VE-cadherin is not sufficient to decrease barrier function of endothelial monolayers." *J Biol Chem* 285(10): 7045-7055.
- Allingham, M. J., J. D. van Buul and K. Burridge (2007). "ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration." *J Immunol* 179(6): 4053-4064.
- Andriopoulou, P., P. Navarro, A. Zanetti, M. G. Lampugnani and E. Dejana (1999). "Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(10): 2286-2297.
- Angelini, D. J., S. W. Hyun, D. N. Grigoryev, P. Garg, P. Gong, I. S. Singh, A. Passaniti, J. D. Hasday and S. E. Goldblum (2006). "TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(6): L1232-1245.
- Arany, Z., S.-Y. Foo, Y. Ma, J. L. Ruas, A. Bommi-Reddy, G. Girnun, M. Cooper, D. Laznik, J. Chinsomboon, S. M. Rangwala, K. H. Baek, A. Rosenzweig and B. M. Spiegelman (2008). "HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1[agr]." *Nature* 451(7181): 1008-1012.
- Baumeister, U., R. Funke, K. Ebnet, H. Vorschmitt, S. Koch and D. Vestweber (2005). "Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation." *EMBO J* 24(9): 1686-1695.
- Beller, T. C., A. Maekawa, D. S. Friend, K. F. Austen and Y. Kanaoka (2004). "Targeted gene disruption reveals the role of the cysteinyl leukotriene 2 receptor in increased vascular permeability and in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice." *Journal of Biological Chemistry* 279(44): 46129-46134.
- Bouillet, L., T. Mannic, M. Arboleas, M. Subileau, C. Massot, C. Drouet, P. Huber and I. Vilgrain (2011). "Hereditary angioedema: key role for kallikrein and bradykinin in vascular endothelial-cadherin cleavage and edema formation." *J Allergy Clin Immunol* 128(1): 232-234.
- Breviario, F., L. Caveda, M. Corada, I. Martin-Padura, P. Navarro, J. Golay, M. Introna, D. Gulino, M. G. Lampugnani and E. Dejana (1995). "Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(8): 1229-1239.

Brown, L. F., A. M. Dvorak and H. F. Dvorak (1989). "LEAKY VESSELS, FIBRIN DEPOSITION, AND FIBROSIS - A SEQUENCE OF EVENTS COMMON TO SOLID TUMORS AND TO MANY OTHER TYPES OF DISEASE." *American Review of Respiratory Disease* 140(4): 1104-1107.

Butcher, R. L., W. E. Collins and N. W. Fugo (1974). "Plasma Concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 β Throughout the 4-Day Estrous Cycle of the Rat." *Endocrinology* 94(6): 1704-1708.

Buteau-Lozano, H., M. Ancelin, B. Lardeux, J. Milanini and M. Perrot-Applanat (2002). "Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Estradiol and Tamoxifen in Breast Cancer Cells A Complex Interplay between Estrogen Receptors α and β ." *Cancer Research* 62(17): 4977-4984.

Caligioni, C. S. (2009). "Assessing reproductive status/stages in mice." *Curr Protoc Neurosci Appendix 4: Appendix 4I*.

Chakraborty, I., S. K. Das and S. K. Dey (1995). "Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation." *J Endocrinol* 147(2): 339-352.

Corada, M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M. G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D. M. McDonald, P. A. Ward and E. Dejana (1999). "Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(17): 9815-9820.

Dejana, E., F. Orsenigo and M. G. Lampugnani (2008). "The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability." *J Cell Sci* 121(Pt 13): 2115-2122.

Engerman, R. L., D. Pfaffenbach and M. D. Davis (1967). "Cell turnover of capillaries." *Lab Invest* 17(6): 738-743.

Esser, S., M. G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana and W. Risau (1998). "Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells." *J Cell Sci* 111 (Pt 13): 1853-1865.

Fan, X., S. Krieg, C. J. Kuo, S. J. Wiegand, M. Rabinovitch, M. L. Druzin, R. M. Brenner, L. C. Giudice and N. R. Nayak (2012). "VEGF blockade inhibits angiogenesis and reepithelialization of endometrium." *The FASEB Journal* 22(10): 3571-3580.

- Ferrara, N., H. Chen, T. Davis-Smyth, H. P. Gerber, T. N. Nguyen, D. Peers, V. Chisholm, K. J. Hillan and R. H. Schwall (1998). "Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis." *Nat Med* 4(3): 336-340.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." *Nat Med* 1(1): 27-31.
- Fraser, H. M., S. E. Dickson, S. F. Lunn, C. Wulff, K. D. Morris, V. A. Carroll and R. Bicknell (2000). "Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor." *Endocrinology* 141(3): 995-1000.
- Friedl, J., M. Puhlmann, D. L. Bartlett, S. K. Libutti, E. N. Turner, M. F. Gnant and H. R. Alexander (2002). "Induction of permeability across endothelial cell monolayers by tumor necrosis factor (TNF) occurs via a tissue factor-dependent mechanism: relationship between the procoagulant and permeability effects of TNF." *Blood* 100(4): 1334-1339.
- Garcia, A. N., S. M. Vogel, Y. A. Komarova and A. B. Malik (2011). "Permeability of endothelial barrier: cell culture and in vivo models." *Methods Mol Biol* 763: 333-354.
- Gavard, J. and J. S. Gutkind (2006). "VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the [beta]-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin." *Nat Cell Biol* 8(11): 1223-1234.
- Gory, S., M. Vernet, M. Laurent, E. Dejana, J. Dalmon and P. Huber (1999). "The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice." *Blood* 93(1): 184-192.
- Gory-Faure, S., M. H. Prandini, H. Pointu, V. Roullot, I. Pignot-Paintrand, M. Vernet and P. Huber (1999). "Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis." *Development* 126(10): 2093-2102.
- Gómez, R., C. Simón, J. Remohí and A. Pellicer (2002). "Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade." *Endocrinology* 143(11): 4339-4348.
- Herren, B., B. Levkau, E. W. Raines and R. Ross (1998). "Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases." *Mol Biol Cell* 9(6): 1589-1601.

Hervé, M. A., G. Meduri, F. G. Petit, T. S. Domet, G. Lazennec, S. Mourah and M. Perrot-Applanat (2006). "Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus." *J Endocrinol* 188(1): 91-99.

Hyder, S. M., Z. Nawaz, C. Chiappetta and G. M. Stancel (2000). "Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor." *Cancer Res* 60(12): 3183-3190.

Janice A. Nagy, L. B., Huiyan Zeng, Ann M. Dvorak, Harold F. Dvorak (2012). "Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis." *Angiogenesis* 11(2): 109.

Kaiser, U. B. (2003). "The pathogenesis of the ovarian hyperstimulation syndrome." *N Engl J Med* 349(8): 729-732.

Kazi, A. A. and R. D. Koos (2007). "Estrogen-Induced Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 α , Vascular Endothelial Growth Factor Expression, and Edema in the Uterus Are Mediated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway." *Endocrinology* 148(5): 2363-2374.

Lambeng, N., Y. Wallez, C. Rampon, F. Cand, G. Christe, D. Gulino-Debrac, I. Vilgrain and P. Huber (2005). "Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues." *Circ Res* 96(3): 384-391.

McClure, N., D. L. Healy, P. A. Rogers, J. Sullivan, L. Beaton, R. V. Haning, D. T. Connolly and D. M. Robertson (1994). "Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome." *Lancet* 344(8917): 235-236.

McClure, N., J. Leya, E. Radwanska, R. Rawlins and R. V. Haning (1992). "Luteal phase support and severe ovarian hyperstimulation syndrome." *Hum Reprod* 7(6): 758-764.

Nagy, J. A., L. F. Brown, D. R. Senger, N. Lanir, L. Vandewater, A. M. Dvorak and H. F. Dvorak (1989). "PATHOGENESIS OF TUMOR STROMA GENERATION - A CRITICAL ROLE FOR LEAKY BLOOD-VESSELS AND FIBRIN DEPOSITION." *Biochimica Et Biophysica Acta* 948(3): 305-326.

Nawroth, R., G. Poell, A. Ranft, S. Kloep, U. Samulowitz, G. Fachinger, M. Golding, D. T. Shima, U. Deutsch and D. Vestweber (2002). "VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts." *EMBO J* 21(18): 4885-4895.

- Potter, M. D., S. Barbero and D. A. Cheresh (2005). "Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state." *J Biol Chem* 280(36): 31906-31912.
- Reynolds, L. P., S. D. Killilea and D. A. Redmer (1992). "Angiogenesis in the female reproductive system." *FASEB J* 6(3): 886-892.
- Scott, D. L., F. Wolfe and T. W. Huizinga (2010). "Rheumatoid arthritis." *Lancet* 376(9746): 1094-1108.
- Shasby, D. M., D. R. Ries, S. S. Shasby and M. C. Winter (2002). "Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282(6): L1330-1338.
- Sidibé, A., T. Mannic, M. Arboleas, M. Subileau, D. Gulino-Debrac, L. Bouillet, M. Jan, T. Vandhuick, X. Le Loët, O. Vittecoq and I. Vilgrain (2012). "Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: Evidence for tumor necrosis factor α -induced VE-cadherin cleavage." *Arthritis Rheum* 64(1): 77-87.
- Slauson, D. O., F. F. Hahn, S. A. Benjamin, T. L. Chiffelle and R. K. Jones (1976). "Inflammatory sequences in acute pulmonary radiation injury." *Am J Pathol* 82(3): 549-572.
- Staley, K. and H. Scharfman (2005). "A woman's prerogative." *Nat Neurosci* 8(6): 697-699.
- Turowski, P., R. Martinelli, R. Crawford, D. Wateridge, A. P. Papageorgiou, M. G. Lampugnani, A. C. Gamp, D. Vestweber, P. Adamson, E. Dejana and J. Greenwood (2008). "Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration." *J Cell Sci* 121(Pt 1): 29-37.
- Vasseur, C., P. Rodien, I. Beau, A. Desroches, C. Gérard, L. de Poncheville, S. Chaplot, F. Savagner, A. Croué, E. Mathieu, N. Lahlou, P. Descamps and M. Misrahi (2003). "A chorionic gonadotropin-sensitive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial gestational spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome." *N Engl J Med* 349(8): 753-759.
- Vittet, D., T. Buchou, A. Schweitzer, E. Dejana and P. Huber (1997). "Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12): 6273-6278.
- Wallez, Y., F. Cand, F. Cruzalegui, C. Wernstedt, S. Souchelnytskyi, I. Vilgrain and P. Huber (2007). "Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site." *Oncogene* 26(7): 1067-1077.

Wallez, Y. and P. Huber (2008). "Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis." *Biochim Biophys Acta* 1778(3): 794-809.

Wallez, Y., I. Vilgrain and P. Huber (2006). "Angiogenesis: the VE-cadherin switch." *Trends Cardiovasc Med* 16(2): 55-59.

Weis, S., S. Shintani, A. Weber, R. Kirchmair, M. Wood, A. Cravens, H. McSharry, A. Iwakura, Y. S. Yoon, N. Himes, D. Burstein, J. Doukas, R. Soll, D. Losordo and D. Cheresch (2004). "Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction." *J Clin Invest* 113(6): 885-894.

Zimmermann, R. C., T. Hartman, S. Kavic, S. A. Pauli, P. Bohlen, M. V. Sauer and J. Kitajewski (2003). "Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development." *J Clin Invest* 112(5): 659-669.

Legends:

Figure 1: VE-cadherin tyrosine phosphorylation on Y685 in hormonal stimulated and non-stimulated ovaries and uterus.

A. C57BL/6 female mice were treated with PMSG/hCG to stimulate the ovulation and the tissue extracts from uterus and ovaries were resolved by western blotting with anti-pY685 and anti-VE-cadherin, VE-cadherin appeared phosphorylated at Y685 in both organs of hormonal-ly stimulated females, this figure is representative of at least three independent experiments; B. Quantification of the extent of VE-cadherin phosphorylation at Y685 induced by hormonal stimulation in uterus and ovaries, standard deviations were high because of the variability of pY685 level in non-treated mice, *: significant difference (p -value<0.05, n =4 per group, Mann and Whitney rank test); C. Illustrative western blot of various levels of pY685 and pSrc(Y418) (kinase active form) in uterus and ovaries of three non-stimulated C57BL/6 females; VE-cadherin and Src levels were used for loading controls; D. Various extent of whole protein tyrosine phosphorylation in non-stimulated animals; β -actin was used for protein load-ing control; E. Relative quantification of pY685 signal extent in ovaries of ten different mice determined by western blotting; the extent of VE-cadherin phosphorylation was highly variable depending on the mouse. U: uterus, O: ovary

Figure 2: VE-cadherin phosphorylation at Y685 along with estrous cycle

A. Evolution in cell composition of mouse vaginal secretion throughout estrous cycle. Mouse estrous cycle is composed of 4 stages (proestrus, estrus, metestrus and diestrus) easily determined with the

proportion of three cell types in the vaginal secretions daily analyzed. There are nucleated epithelial cells (round shaped), cornified epithelial cells and lymphocytes as indicated in the scheme. Based on previous studies, this scheme allows the identification of the precise estrous stage daily just by visualizing the vaginal secretion with phase contrast microscopy. The purple line indicates the ovulation time within the estrous cycle. The scheme is read clockwise as indicated. B. Phase contrast images of cells within C57BL/6 mouse vaginal smear illustrating the four stages of estrous cycle, these stages were identified by analyzing the cell types composing the vaginal secretion as indicated in panel A; C. C57BL/6 female mice were sacrificed at one of the four stages of estrous cycle, VE-cadherin was immunoprecipitated from uterus and ovaries and then its tyrosine phosphorylation status was determined along with estrous cycle; VE-cadherin tyrosine phosphorylation extent was highest at the estrus phase in both organs. D. Relative quantification of the evolution of VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse uterus and ovary along estrous cycle (left and right panels respectively). E. Analysis of Src kinase activation status throughout estrous cycle with anti-pSrc(Y418), Src was highly activated at the estrus phase in the same fashion than VE-cadherin; F. Examination of phosphorylated tyrosine in VE-cadherin with antibody specific to pY685; Y685 was phosphorylated in the same manner than the global tyrosine phosphorylation of VE-cadherin; G. Levels of the whole protein tyrosine phosphorylation in ovary and uterus along estrous cycle. All the results are representative of at least three independent experiments.

Figure 3: Vascular remodeling taking place after ovulation in the corpus luteum and VE-cadherin tyrosine phosphorylation

A. Scheme of the profile of VE-cadherin tyrosine phosphorylation at Y685 (in ordinate axis) throughout estrous cycle (in abscissa) and the concomitant vascular remodeling events occurring in ovarian follicles; the level of VE-cadherin phosphorylation at Y685 was highest at estrus, the stage at which the post ovulatory angiogenesis occurs in the corpus luteum. B. Ovarian vasculature features at proestrus and metestrus by staining VE-cadherin (green) and PECAM (red) and hoescht (blue). The merge allowed to better visualize the vasculature only in theca folliculi at proestrus (before ovulation) while newly formed blood vessels were penetrating in the corpus luteum at metestrus. Follicles are indicated with white dashed lines; scale bar: 200 μ m, red frames are magnifications of follicles within ovary sections; black arrowhead indicates thecal blood vessels, black arrow indicates corpus luteum new formed blood vessels, GF: Granulosa follicle, CL: corpus luteum.

Figure 4: Homozygous VE-Y685F mice and VE-cadherin expression

A. Heterozygous WT/VE-Y685F mice were intercrossed and the pup number for the three genotypes (wt/wt, wt/ki and ki/ki) was determined and presented within the graph, it is mean \pm sd, wt: wild-type, ki: VE-Y685F knock-in; B. VE-cadherin expression extent in different organs (uterus, kidney, liver and lung) of VE-Y685F and wild-type mice, determined by western blotting. No significant difference

was noticeable between the two strains; C. Homo-zygous WT or VE-Y685F mice were sacrificed by cervical dislocation and different organs were collected for VE-cadherin and SFK expression analysis. Namely uterus, kidney, liver and lung were lysed and the proteins extracted and resolved by SDS-PAGE. The same filter was used to immune-blot VE-cadherin, SFK and actin; D. Immunofluorescence of lung sections containing a large blood vessel from VE-Y685F mice with antibodies to PECAM (green) and VE-cadherin (red), VE-cadherin is present at endothelial cell junctions (white arrow) in blood vessels; the scale bar: 80 μ m. these results are representative of at least three different experiments.

Figure 5: VE-Y685F mutation favors edema formation and fibrogenesis within mouse uterus

In situ macromorphology of normal uterus from C57BL/6 (A), hypertrophic and edematous uterus from VE-Y685F females (B, C respectively); yellow dashed line demarcate the uterus shapes in wild-type and VE-Y685F mice, U: uterus and B: bladder, scale bar: 4 mm; D. Comparison of C57BL/6 and VE-Y685F uterus diameters, the black bar indicate the mean and the star (*: $P < 0.05$), each dot spot represents the diameter of one female mouse, the uterus of VE-Y685F tends to exhibit increased size due to edema or hypertrophy; E. Uterus diameter distribution within three groups of ages in C57BL/6 and VE-Y685F as indicated, VE-Y685F mouse presents more edematous uterus from 4 to 14 month old; F. Schematic representation a uterus horn longitudinally and transversally sectioned where longitudinal (ML) and circular (MC) layers of myometrium, endometrium (E), uterine glands (G) and uterine lumens (L) are noticeable; G. Histological analysis of C57BL/6 and VE-Y685F mice uteri with HE staining; lower panels (d, e and f) are fivefold magnifications of areas within the blue frames within a, b and c respectively as indicated with blue dashed lines; some areas with sparse cells (ASC) and edematous uterine glands (G*) are noticeable in VE-Y685F mouse uterus; yellow dashed lines delimit the different layers in uterus; ML: longitudinal myometrium, MC: circular myometrium, E: endometrium, L: uterine lumen, G: uterine gland, G*: edematous uterine gland

Figure 6: Fibrotic zones appear around blood vessels and correlate with stromal or muscle cell demise in VE-Y685F mouse uterus

A. Hematoxylin and picosirius red staining of uterus sections of wild-type C57BL/6 and VE-Y685F females as indicated to observe cell nuclei and collagen fiber expression respectively; black dashed lines delimit uterus tissue layer, double headed arrows show the limits of the indicated structures, ML: longitudinal myometrium, MC: circular myometrium, E: endometrium, ND: normal density, LD: low density in areas with sparse cells, scale bar: 0.3 mm; B. Comparative graph of myometrial and endometrial cell densities in wild-type C57BL/6 uterus (C57), VE-Y685F uterine intact zone (ki ND) and VE-Y685F uterine areas of sparse cells (ki LD), cell densities were determined in myometrium and endometrium by staining uterus sections with hematoxylin, the relative densities is presented with the bars and standard deviation, ***: p -value < 0.0001 . C. Hematoxylin/eosin (upper panel) and masson's

trichrome (lower panel) staining of VE-Y685F uterus sections containing different sizes of ASC as indicated; collagen fibers are stained in blue, cell nuclei in black, muscle cell and cytoplasm in red; dashed lines indicate the limits of ASC; *: large blood vessels, arrow: capillary, arrowhead: collagen concentrated around blood vessels; ASC are rich in capillaries and blood vessels. These results are representative of at least three different experiments.

Figure 7: Blood vessels become predominant in large ASCs

Uterus sections containing different size of areas with sparse cells (ASC) from VE-Y685F mice were stained with anti-VE-cadherin and counterstained with hematoxylin to visualize endothelial cells and the surrounding cells (stromal or muscle cells) in increasing sizes of ASC, are presented respectively in a, b, c, d and e; Endothelial cell (EC) and the surrounding cell densities in each panel were determined and presented in f, VE-cadherin and hematoxylin positive (in a radius of 20 μ m) cells were considered as endothelial cells (EC), hematoxylin only -positive cells were considered as the other cell types around EC; the pictures presented are representative of at least fifteen sections analyzed in the same conditions

Figure 8: VE-Y685F mutation favors the appearance of spontaneous ohss-like phenotypes

A. In situ macromorphological features of ovaries from wild-type and VE-Y685F mice; the knock-in mouse presented edematous ovaries; white dashed lines shows the delimitation of the ovaries, black star (*) indicates edematous areas, scale bar: 3 mm; B. Histological analysis of C57BL/6 and VE-Y685F animal ovaries by hematoxylin and eosin staining; edematous follicles were observable in VE-Y685F mouse; This phenotype was noticeable in ~30% of VE-Y685F female mice; At least 20 female mice were analyzed in these experiments; dashed lines show the ovary shapes, black star (*) indicates edema, scale bar: 1 mm.

Figure 9: VE-Y685F mouse is more sensitive to VEGF-induced vascular permeability

A. Mouse spontaneous capillary permeability in the skin, wild-type and VE-Y685F male mice were injected intravenously with Evans blue (EB) and the inner side of the skin was analyzed 30 min later; blue spots due to EB leakage (indicated by arrowheads) from capillaries were noticeable in VE-Y685F mouse skin. B. Quantification of spontaneous EB leakage by counting the number of blue spot in the skin of 11 male mice of each strain (wild-type and VE-Y685F); each black dot-spot in the graph corresponds to one mouse, black circles and squares indicate respectively wild-type and VE-Y685F mice, black lines highlight means of the blue spot numbers; *: significant difference when $p < 0.05$ (Mann and Whitney rank test); C. Vascular permeability induced by VEGF in Miles assay, wild-type and VE-Y685F male mice were initially injected intravenously with EB and 10 min later, received intradermal injection of two doses of VEGF (100 and 250 ng) in the left and right sides of the mice. The inner side of the skins was examined to observe EB incorporations around the injection sites. D. Quan-

tification of VEGF-induced EB incorporation in the skin, the results are means \pm sd (μ g of EB/mg of skin); **: $p < 0.001$ (Mann and Whitney rank test); the results presented are representative of at least six independent experiments with different mice.

Figure 10: VE-cadherin remains phosphorylated along with estrous cycle in VE-Y685F mouse

A. C57BL/6 and VE-Y685F female mice were sacrificed at one of the four stages of estrous cycle, VE-cadherin was immunoprecipitated from uterus and then after their tyrosine phosphorylation status for specific residues were determined along estrous cycle with antibodies specific to pY685, VE-cadherin was used as the loading control; VE-cadherin was no longer phosphorylated at Y685 whatever the estrous phase in VE-Y685F females; B. The extent of VE-cadherin tyrosine phosphorylation at all tyrosine residues was examined with anti-phosphotyrosine using the same filter than in (A); it remained phosphorylated at other tyrosine residues than Y685. All the results are representative of at least three independent experiments with tissue extracts from different mice at each estrous stage.

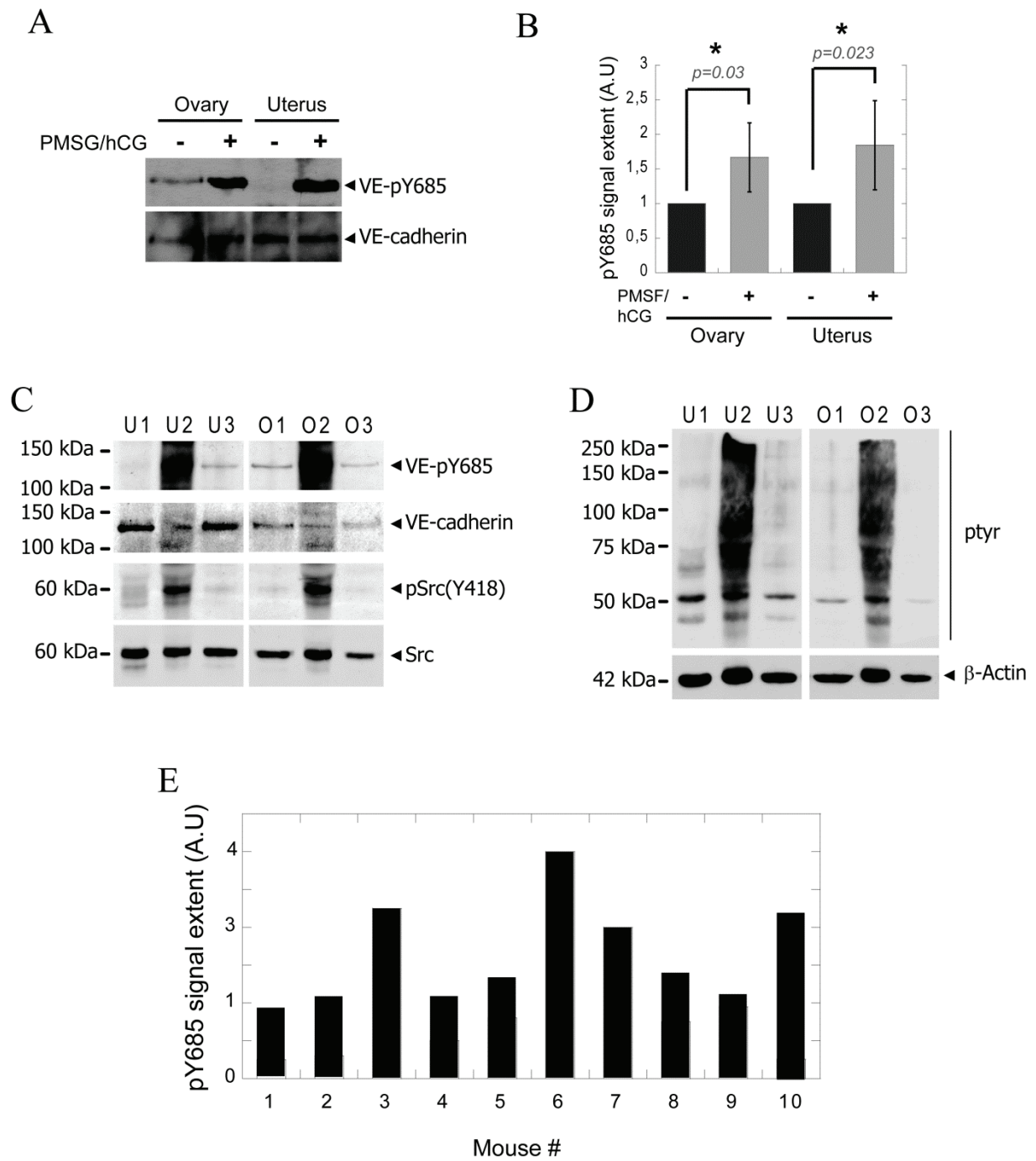


Figure 1

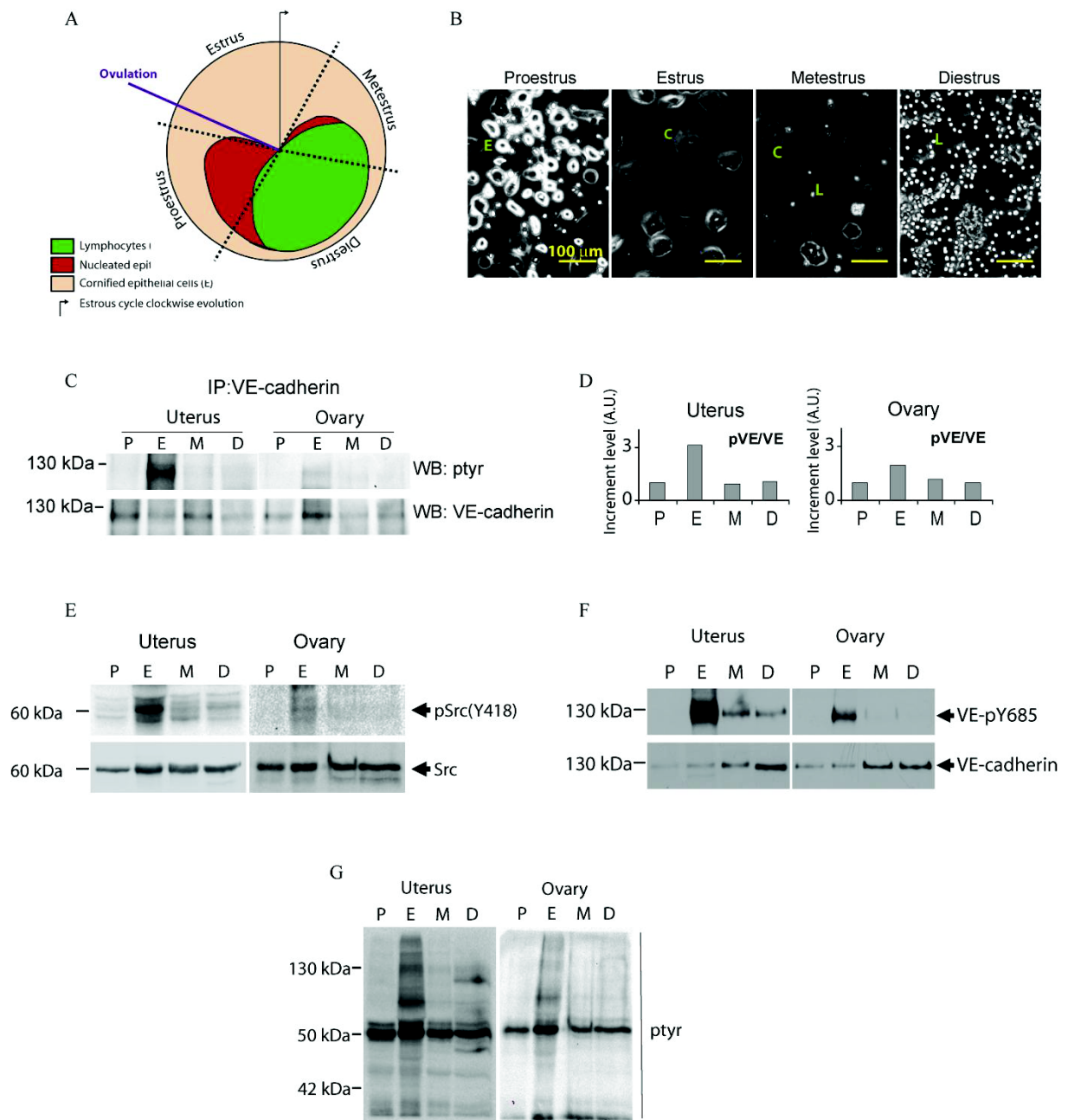


Figure 2

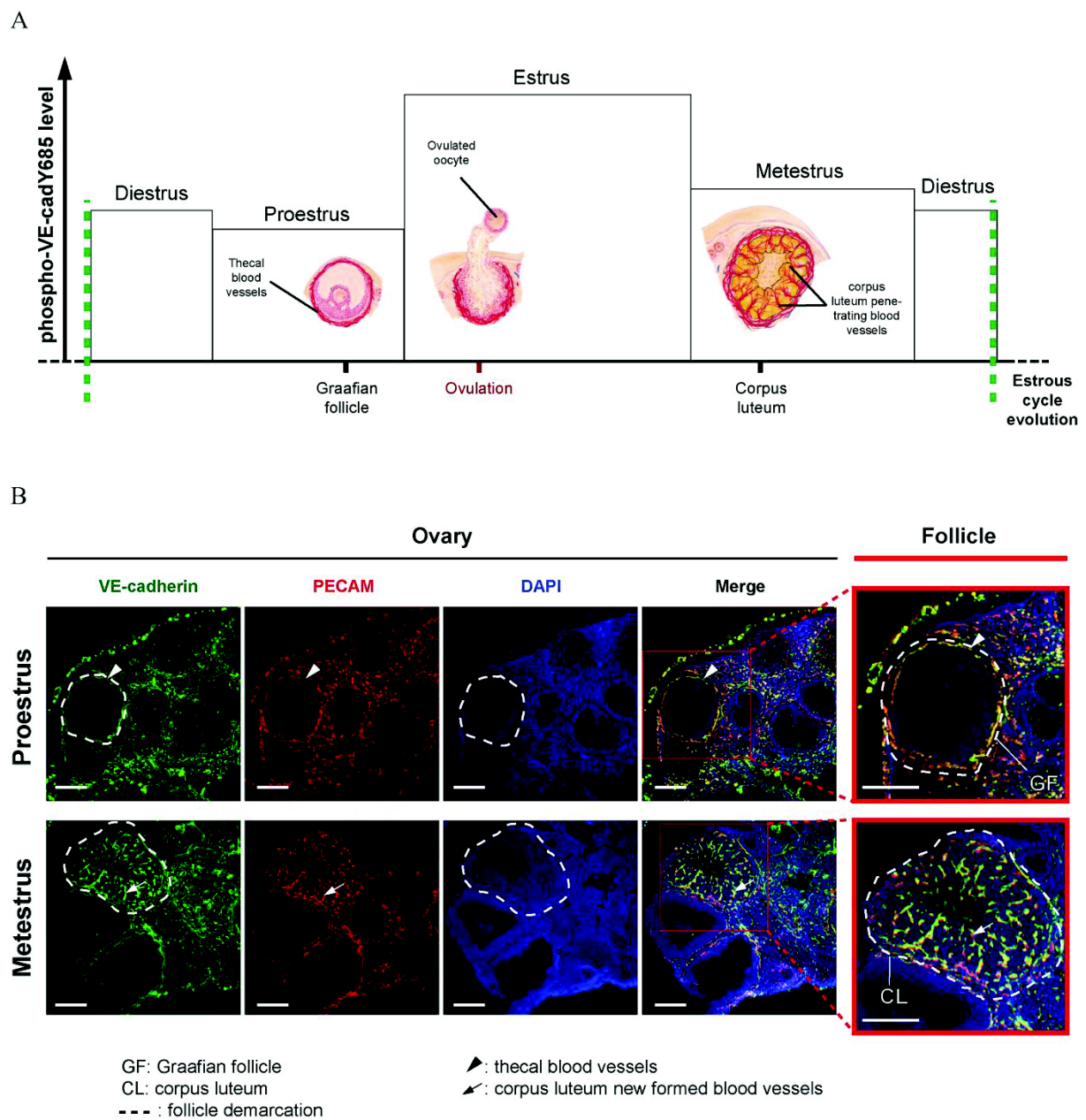


Figure 3

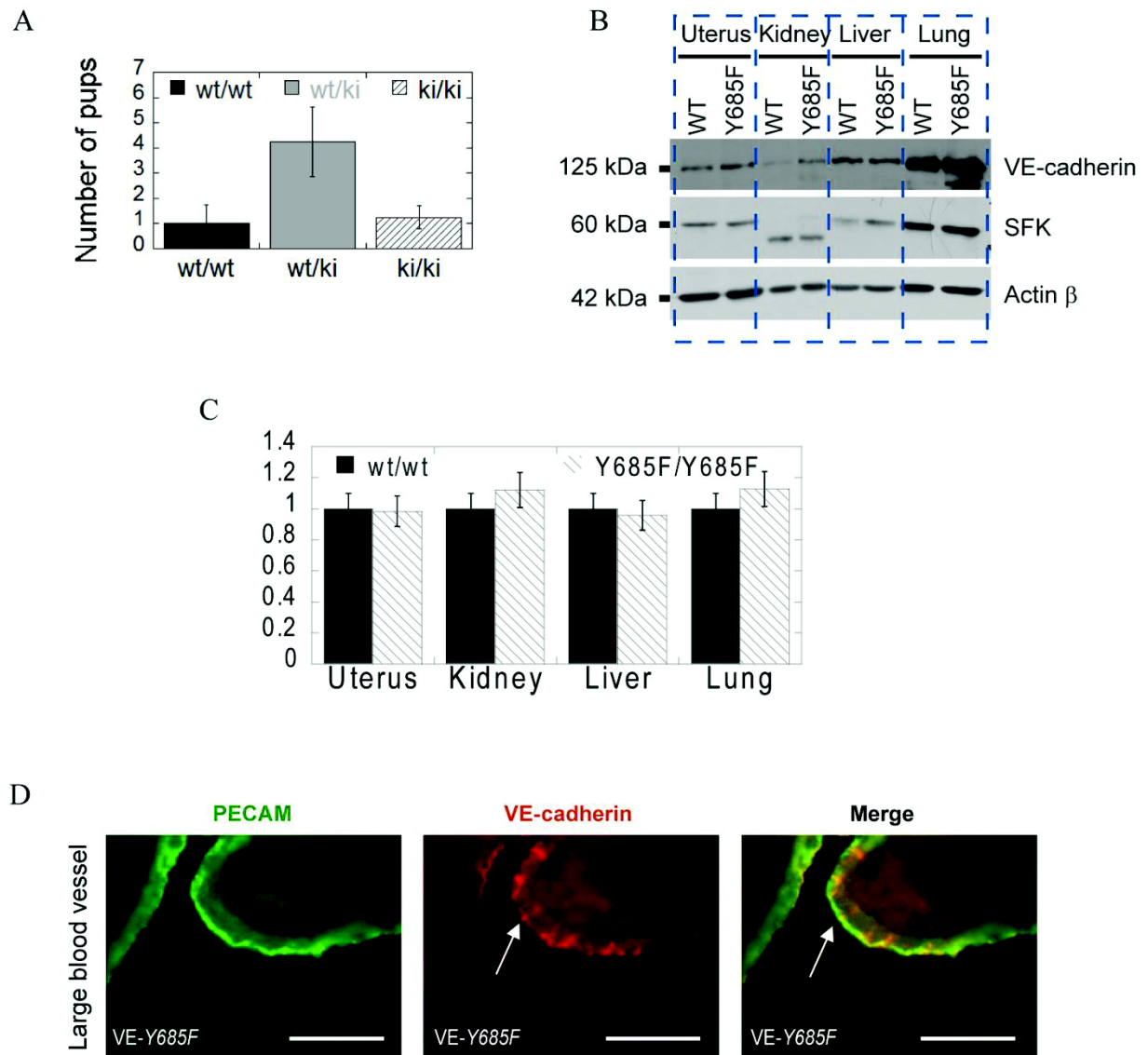


Figure 4

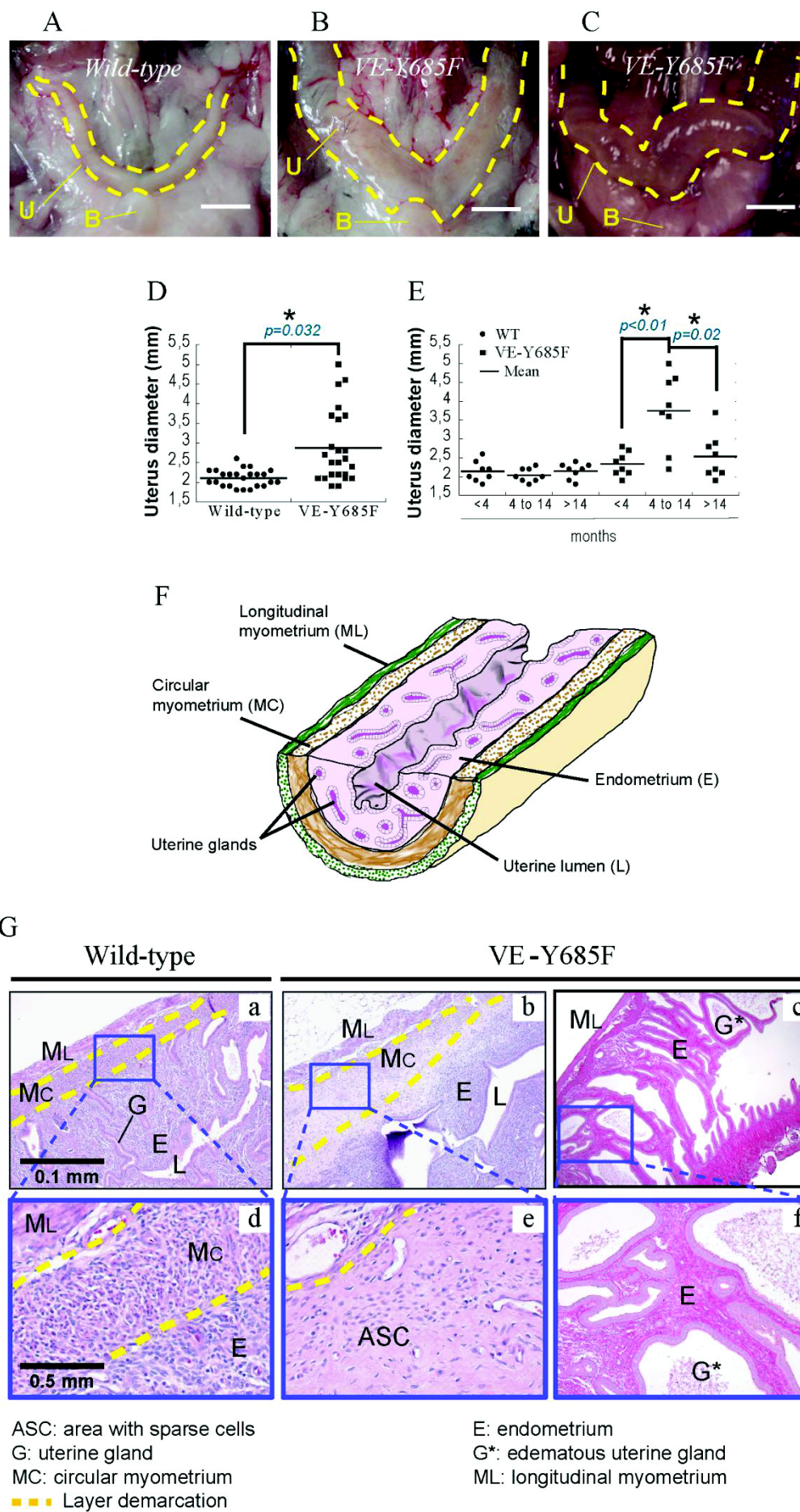


Figure 5

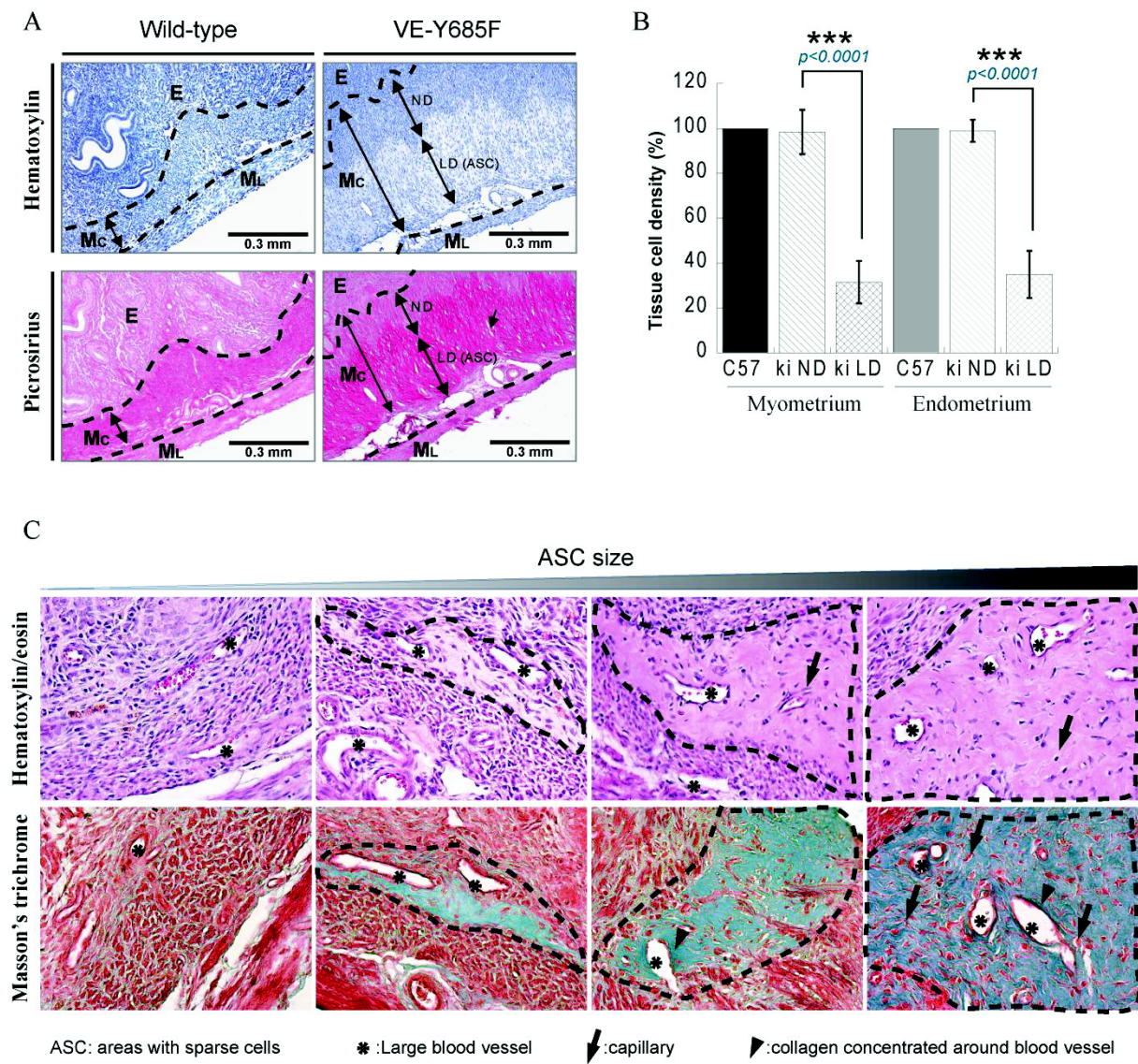


Figure 6

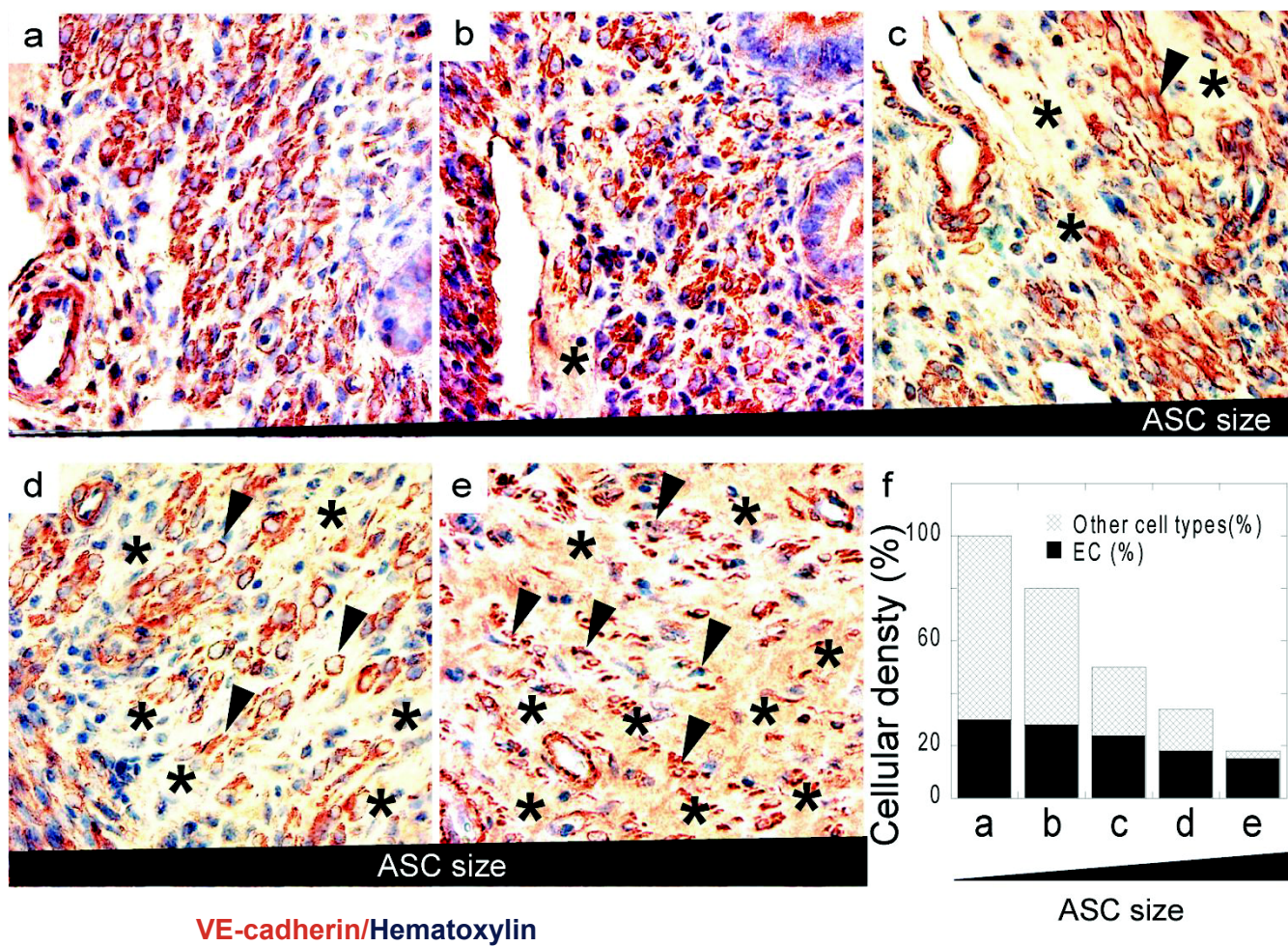


Figure 7

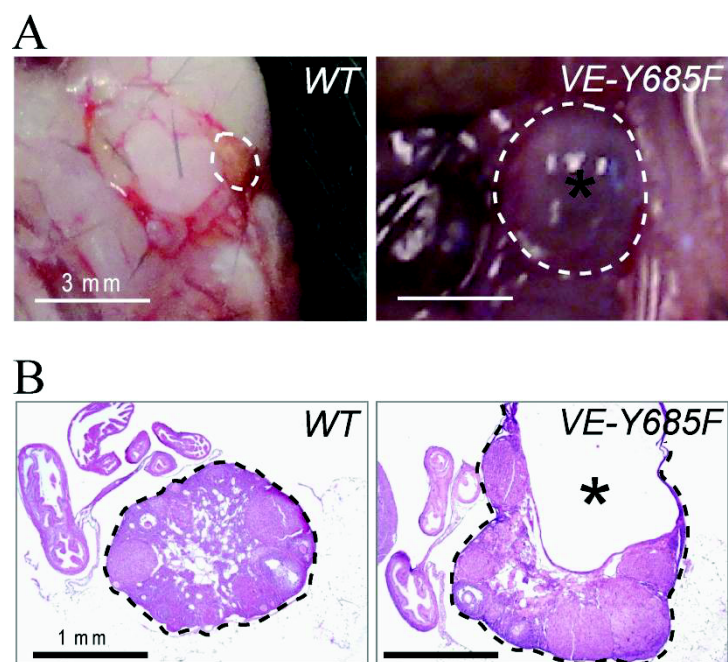


Figure 8

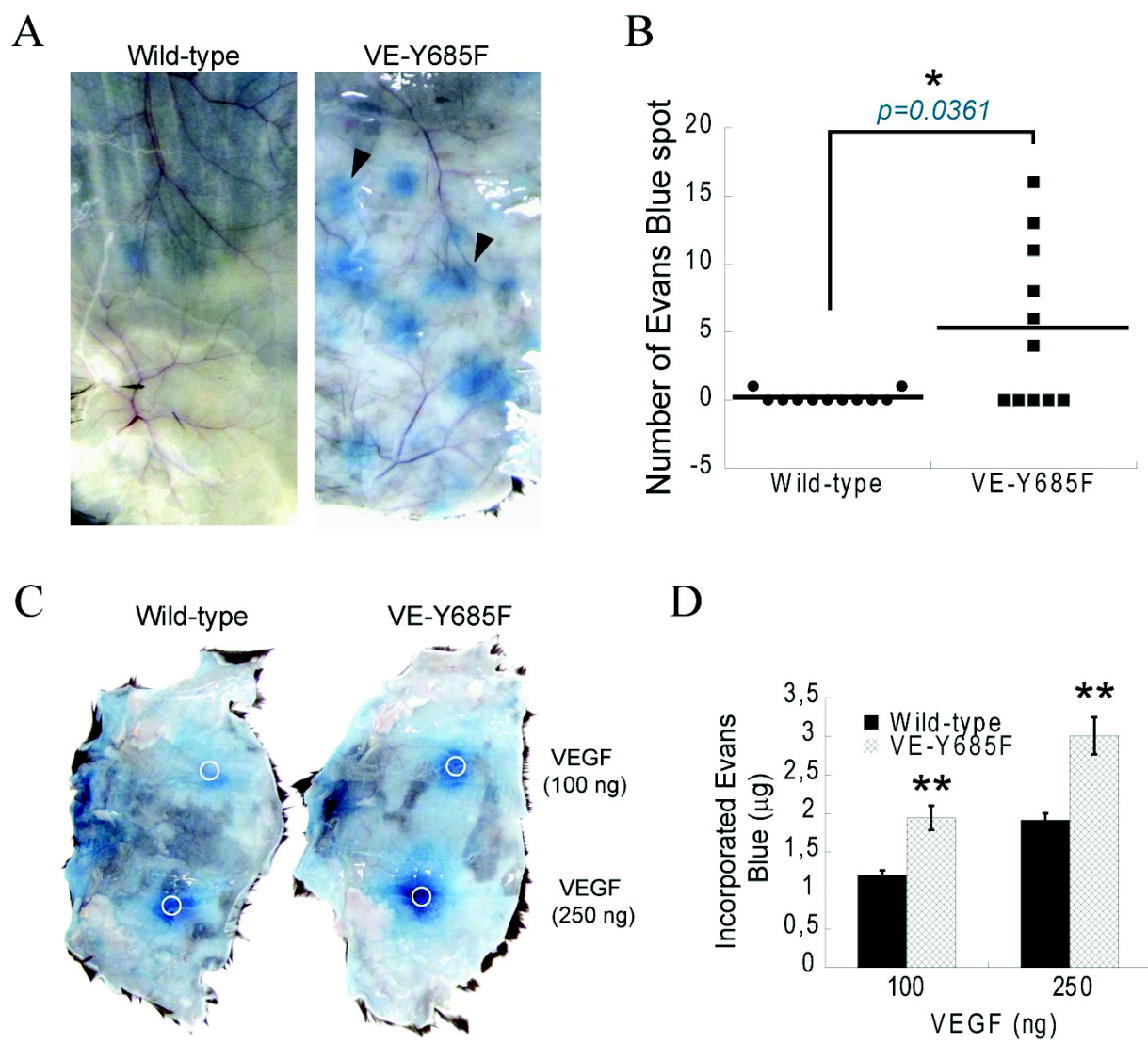


Figure 9

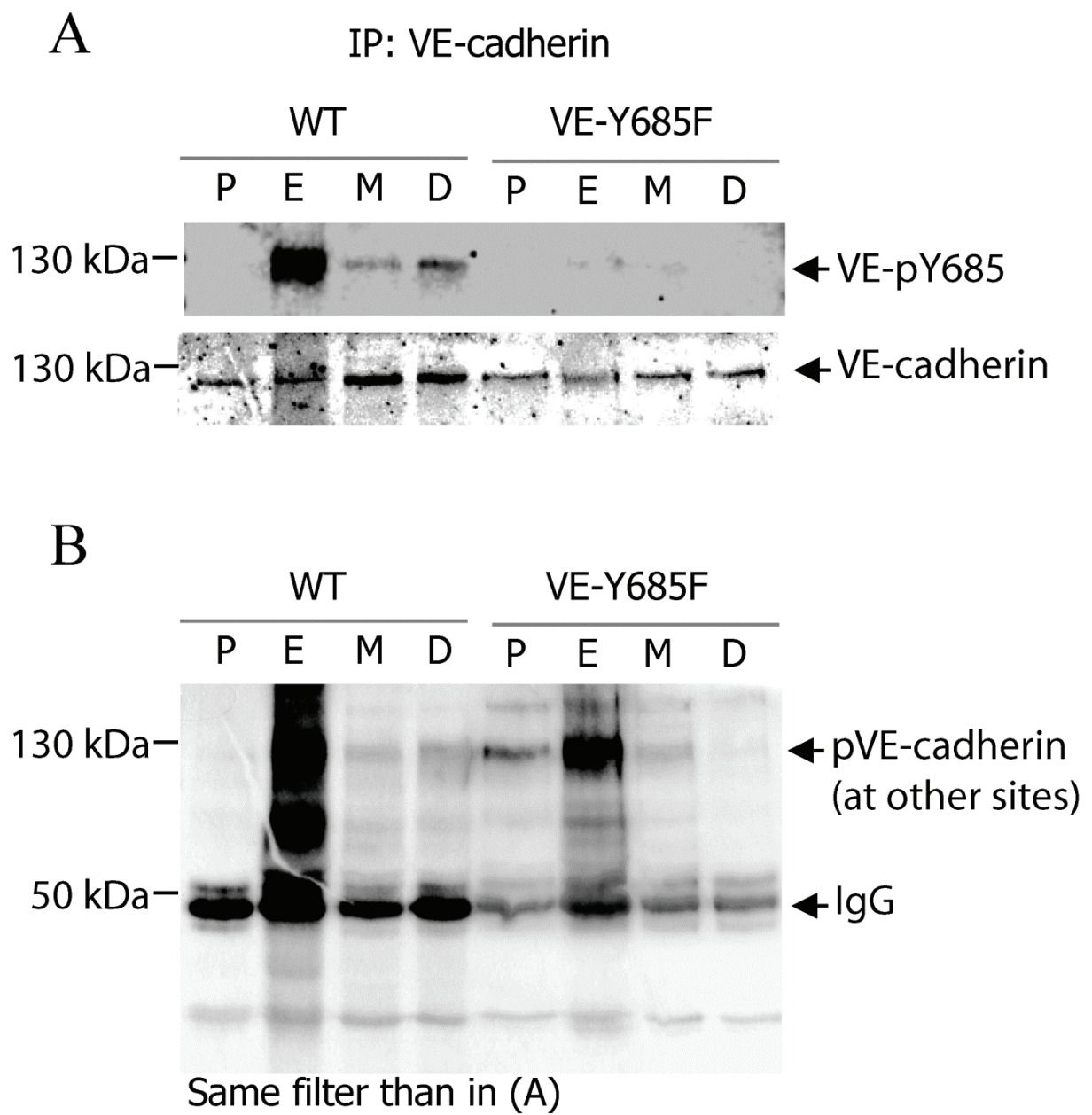


Figure 10

SUPPLEMENTAL DATA OF THE MANUSCRIPT ENTITLED:

Mouse estrous cycle is a physiological regulator of VE-cadherin phosphorylation in vivo:

Analysis of VE-Y685F knock-in mice

Adama Sidibé et al

Supplementary result

Anti-pY685 antibody recognizes specifically VE-cadherin phosphorylated at Tyr685

To analyse VE-cadherin Y685 phosphorylation in vivo, we developed a rabbit polyclonal anti-phosphoY685 (anti-pY685). The specificity of the antibody was tested by western blotting (WB) using the non-phosphorylated and the phosphorylated synthetic peptide span Y685 residue. As shown in Figure S2A, anti-pY685 antibody recognized the phosphorylated peptide but not the non-phosphorylated one. Using the recombinant VE-cadherin cytoplasmic domain carrying or not Y685F mutation, we demonstrate that only the phosphorylated wild-type cytoplasmic tail was detectable with the anti-pY685. When peptideY685 or Y645 were used as competitors in the tyrosine phosphorylation assay, this signal disappeared only with peptide Y685 (Fig S2B). The anti-pY685 was then tested for its ability to recognize specifically tyrosine phosphorylated VE-cadherin in HUVECs upon VEGF challenge. The WB analysis of cell lysates demonstrated the presence of pY685 VE-cadherin in VEGF-treated HUVEC (Fig S2C). The anti-pY685 antibody was next tested in immunofluorescence experiments. As shown in Figure S2D, anti-pY685 VE-cadherin staining was located at cell junctions and co-localized with VE-cadherin staining in VEGF-treated HUVEC. Altogether, these results demonstrate the specificity of anti-pY685 toward VE-cadherin phosphorylated at Y685.

Supplemental figure legends

Figure S1: Production of VE-Y685F transgenic mice and VE-cadherin expression

A. The codon encoding VE-cadherin Y685 is located in VE-cadherin exon 12 (yellow box) as indicated in the *VE-cad^{WT}* locus. Two DNA fragments, one spanning exon 12 and the other containing part of intron 12, were amplified by PCR and linked on each side of a *PGK-Neo* cassette (*Neo*) containing 2

LoxP sites at each end. The Y685 codon (TAC) was mutated into phenylalanine codon (TTC). The resulting targeting vector was electroporated in ES cells to produce a *VE-cad*^{Neo} locus. Mice homozygous for *VE-cad*^{Neo} were mated with transgenic mice expressing Cre recombinase (Tg-CMV-Cre) at high levels. Progeny was selected for ablation of the *Neo* gene (green box) on both loci (*VE-Y685F*). B. Southern blots showing ES cell DNA digests with BglII or XbaI and hybridized with a *Neo* probe. BglII (B) and XbaI (X) sites are positioned in panel (A) on the *VE-cad*^{Neo} locus. Hybridization revealed bands at expected sizes (in kb) in a recombinant clone (Re) and not in a control clone (Co). C. PCR product of VE-Y685F DNA fragments, containing the remaining LoxP sequence, allowing to distinguish knock-in mice genotype from wild-type one; WT fragment was found around 200 bp whereas VE-Y685F fragment containing the remaining LoxP sequences was around 300 bp.

Figure S2: Validation of anti-pY685 to specifically recognize only polypeptides containing pY685

A. Y685 containing peptide (pep685) was subjected to Src phosphorylation assay or not and resolved by western blotting, pep685 and phosphor-pep685 sequences were indicated; only the phosphorylated peptide was recognized with anti-pY685; B. recombinant VE-cadherin cytoplasmic domain (VE-cyto) carrying or not the Y685F mutation was phosphorylated or not by Src in presence of either pep685 or pep645 containing respectively Y685 and Y645 as indicated, anti-pY685 recognized only the non-mutated VE-cyto *wt* when phosphorylated in absence of pep685 as a competitor while VE-cyto was detectable wherever it was used; C. HUVEC were stimulated or not with VEGF and cell lysates were analyzed with anti-pY685 and anti-VE-cadherin, only pVE-cadherin (125 kDa) of VEGF-treated cells was recognized; D. Immunofluorescence of VEGF-treated HUVEC with anti-pY685 and anti-VE-cadherin, red: pY685, green: VE-cadherin; scale bars are indicated; these figures are representative of at least three different experiments.

Figure 3: Blood vessels become predominant in large ASCs

Uterus sections containing different size of areas with sparse cells (ASC) from VE-Y685F mice were stained with anti-VE-cadherin and counterstained with hematoxylin to visualize

endothelial cells and the surrounding cells (stromal or muscle cells) in increasing sizes of ASC, are presented respectively in a, b, c, d and e; Endothelial cell (EC) and the surrounding cell densities in each panel were determined and presented in f, VE-cadherin and hematoxylin positive (in a radius of 20 μ m) cells were considered as endothelial cells (EC), hematoxylin only -positive cells were considered as the other cell types around EC; the pictures presented are representative of at least fifteen sections analyzed in the same conditions.

Supplemental figures

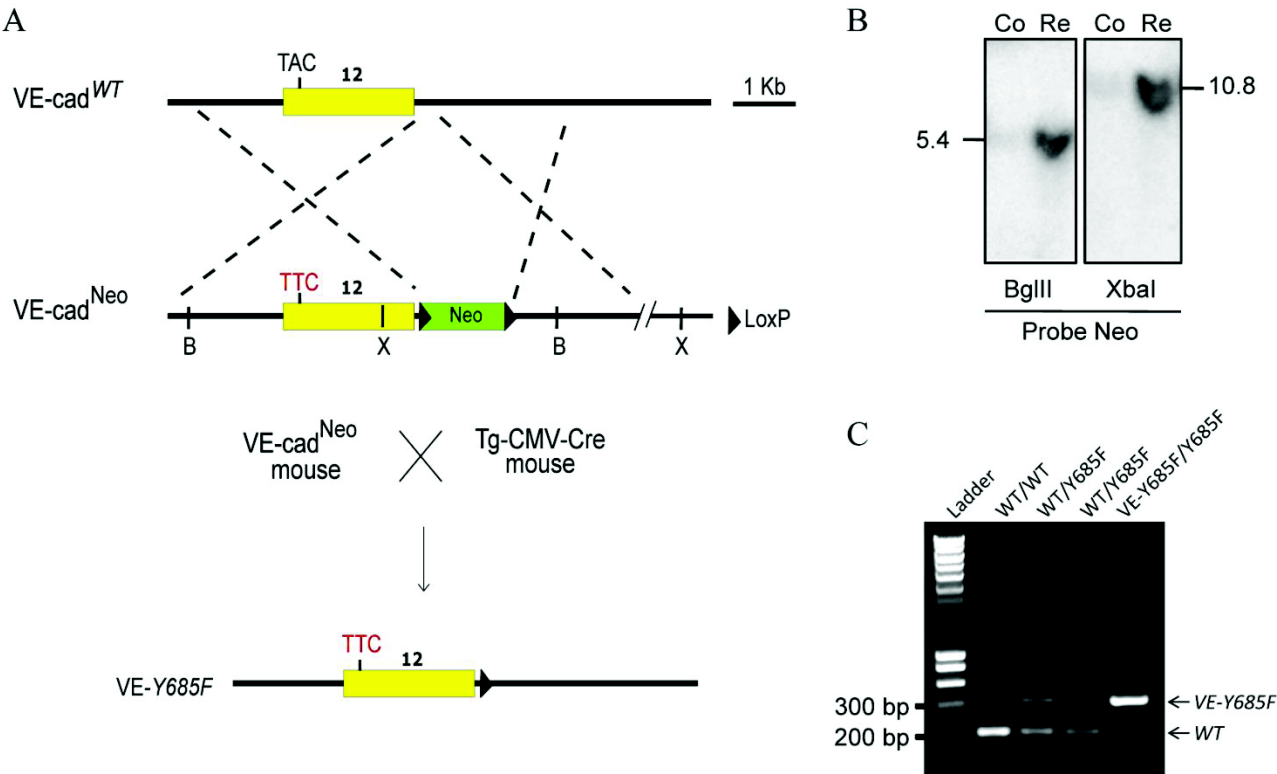


Figure S1

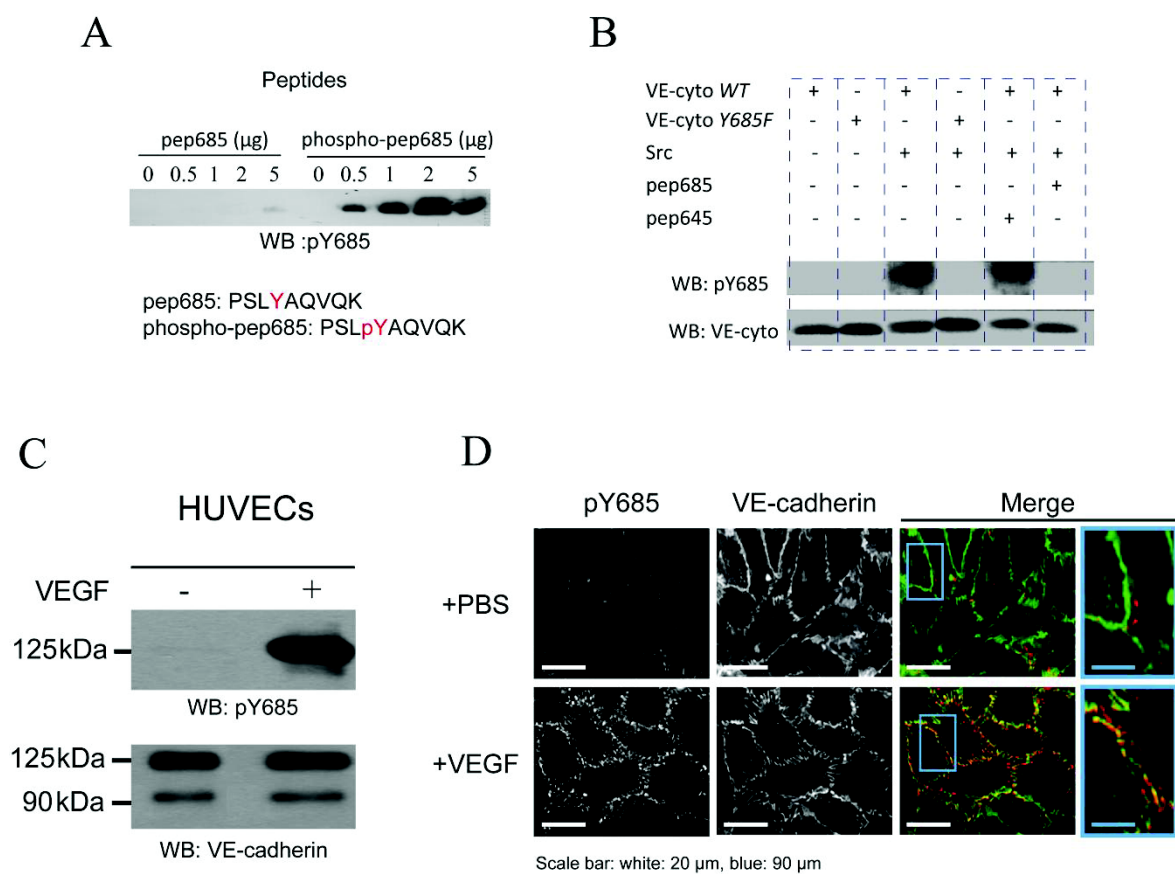


Figure S2

Supplemental Table S1: Gender analysis of homozygous litters

	<i>Genotype</i>	
	<i>wt/wt</i>	<i>Y685F/Y685F</i>
Female	4 (3)	3 (2)
Male	4 (2)	5 (2)
Number of Litters	8 (2)	8 (3)
<i>The values represent Mean (sd)</i>		

II.5 Discussion et perspectives de l'article 2

La VE-cadhérine est cruciale pour l'intégrité de l'endothélium vasculaire et les changements de la fonction de barrière endothéliale, qui ont lieu au cours de l'angiogénèse ou la perméabilité vasculaire, induisent de modifications de la VE-cadhérine. La phosphorylation de la VE-cadhérine est bien connue pour être corrélée à l'augmentation de la perméabilité vasculaire bien que son rôle effectif dans ce processus soit jusqu'à présent inconnu. La phosphorylation de la VE-cadhérine sur des tyrosines spécifiques a aussi été bien étudiée *in vitro* dans de nombreux processus physiologiques comme la régulation de la prolifération de cellules endothéliales ou encore la transmigration leucocytaire induites par des médiateurs angiogéniques ou inflammatoires (Baumeister, Funke et al. 2005, Wallez, Cand et al. 2007, Turowski, Martinelli et al. 2008). Bien que quelques études sur la phosphorylation globale sur tyrosine de la VE-cadhérine aient été menées *in vivo*, les sites exacts de ces phosphorylations n'ont jamais investigués à ce jour (Weis, Shintani et al. 2004, Lambeng, Wallez et al. 2005). Dans cette partie de ma thèse, nous avons étudié la phosphorylation de la VE-cadhérine spécifiquement sur Y685 dans des contextes d'angiogénèse et de perméabilité vasculaire *in vivo*. En 1998, Ferrara et al ont montré que le VEGF était nécessaire pour l'angiogénèse du corps jaune (Ferrara, Chen et al. 1998), de même Shweiki et al ont montré l'expression de VEGF dans les follicules ovariens et corps jaunes ainsi que la présence de récepteurs du VEGF sur les cellules endothéliales quiescentes et en prolifération (Shweiki, Itin et al. 1993). Ces mêmes auteurs et d'autres ont montré de façon plus générale l'expression de VEGF dans toutes les glandes endocrines (VILGRAIN 2007). De nombreux modèles d'étude de l'angiogénèse ont été proposés mais les mieux adaptés sont ceux qui ont des processus programmés dans lesquels certains spécimens représentent toutes les étapes de l'angiogénèse, y compris les événements déclencheurs et les réponses conséquentes. L'appareil reproducteur femelle est soumis à un certain nombre de processus de néovascularisation programmés associés à l'évolution cyclique et le déclin des structures ovariennes et utérines. Le cycle ovarien est régi par la sécrétion cyclique des gonadotrophines à partir de tissus extra-ovariens. L'ovaire possède les récepteurs des gonadotrophines qui vont gouverner ses capacités stéroïdogéniques et génère des stéroïdes ovariens qui régulent également les cycles de l'endomètre. Les pics de facteurs angiogéniques produits au sein du système reproducteur sont aussi coordonnés par les gonadotrophines et/ou par les stéroïdes produits localement. Il a en effet été montré que, plusieurs hormones dont les estrogènes régulent de façon positive l'expression du VEGF (Buteau-Lozano, Ancelin et al. 2002, Hervé, Meduri et al. 2006, Kazi and Koos 2007, Arany, Foo et al. 2008) par une action au niveau du promoteur du gène de VEGF qui contient deux éléments de réponse aux œstrogènes (EREs pour estrogen response elements) (Chakraborty, Das et al. 1995, Hyder, Nawaz et al. 2000) D'autres études ont confirmé l'importance cruciale de VEGF et de VEGFR-2 dans l'angiogénèse et la perméabilité vasculaire dans l'ovaire et l'utérus (Fraser, Dickson et al. 2000, Zimmermann, Hartman et al. 2003, Fan, Krieg et al. 2012) qui sont également importantes pour préparer l'endomètre utérin à la nidation (Folkman 1995). De façon intéressante, nous avons

montré dans cette étude que les souris stimulées avec les hormones PMSG/hCG présentent une forte augmentation de la phosphorylation sur le site Y685 de la VE-cadhérine dans l'ovaire et l'utérus, suggérant une régulation hormonale de ce processus. Nos résultats sur le cycle ovarien ont permis d'étayer cette hypothèse en montrant que la VE-cadhérine est effectivement phosphorylée de façon cyclique et de façon prédominante en phase estrus, ce qui suggère que la forte sécrétion d'œstrogènes en phase proestrus permet une augmentation de VEGF conduisant à la phosphorylation du site Y685 au stade estrus. (Butcher, Collins et al. 1974, Staley and Scharfman 2005). Toutefois, on ne peut pas exclure que cette phosphorylation soit dépendante des hormones sécrétées en estrus car une publication a montré *in vitro* que le 17- β -estradiol pouvait induire la phosphorylation sur tyrosine des protéines des jonctions adhérentes y compris la VE-cadhérine, un mécanisme corrélé à une augmentation de perméabilité (Groten, Pierce et al. 2005). Néanmoins *in vivo*, il semble improbable que les œstrogènes soient responsables directement de la phosphorylation de la VE-cadhérine observée en phase estrus car elles sont sécrétées en proestrus. L'effet des hormones sécrétées en estrus comme la progestérone, sur la phosphorylation de la VE-cadhérine, n'a pas encore été exploré. Au total, le patron dynamique de cette phosphorylation au cours du cycle ovarien fait de ce dernier, le premier modèle physiologique d'étude de cette modification covalente de la VE-cadhérine *in vivo*.

Alors que de nombreuses études sur la phosphorylation de la VE-cadhérine ont été documentées *in vitro*, aucune donnée *in vivo* n'est encore parue sur l'implication des différents sites de phosphorylation. L'obtention d'une souris knock-in (KI ou VE-Y685F) était un challenge et était motivé par la forte affinité de c-Src pour le peptide synthétique comportant la séquence : RPSLYAQVQK. La séquence de ce peptide est unique à la VE-cadhérine ce qui en fait aussi son originalité. L'obtention des homozygotes et l'amplification de l'élevage ont nécessité quelques mois avant de pouvoir commencer les premières observations qui ont été entreprises au plan macroscopique d'abord puis au plan histologique. Les souris homozygotes présentent un phénotype viable sans anomalies extérieures spontanément détectables (sauf rares cas). La découverte de l'hypertrophie utérine et ovarienne a été fortuite mais a montré une grande spécificité des souris VE-Y685F et n'a jamais été observée chez les souris WT. Nos données montrent que l'absence de phosphorylation sur le site Y685 de la VE-cadhérine semble accompagner la perméabilité vasculaire induite par des médiateurs comme VEGF avec une plus grande susceptibilité des souris VE-Y685F à développer des œdèmes ovariens et de la fibrose utérine associée et des zones de faible densité cellulaire indicatrices d'une altération de l'approvisionnement en nutriments et le signe d'une altération due à des perméabilités vasculaires antérieures (Slauson, Hahn et al. 1976, Brown, Dvorak et al. 1989). En effet, la perméabilité vasculaire induite par des événements physiopathologiques provoque de l'œdème auquel s'associent des dommages du tissu environnant, suivis par de la fibrose réparatrice (Nagy, Brown et al. 1989, Beller, Maekawa et al. 2004, Weis, Shintani et al. 2004). Le protocole d'hyperstimulation ovarienne que nous avons utilisé sur les souris WT est similaire à celui utilisé dans le traitement d'induction d'ovulation, où le recrutement et le maintien d'un grand nombre de follicules ovariens est induite par l'hormone

gonadotrope stimulant les follicules, combinée avec une dose non physiologique de l'hormone chorionique humaine. Une complication principale du traitement médical d'induction de l'ovulation est le syndrome d'hyperstimulation ovarienne (OHSS). Fait intéressant, le problème sous-jacent à un OHSS est le passage de fluides corporels du lit vasculaire dans l'espace interstitiel. Il se caractérise par des follicules œdémateux suite à une forte augmentation de la perméabilité vasculaire (McClure, Leya et al. 1992, Kaiser 2003). Le phénotype des souris VE-Y685F a été observé chez des souris nullipares, certaines femelles ayant une grande facilité à faire des bébés ont été gardées pour amplifier l'élevage, cependant les souris femelles VE-Y685F sont fertiles, ce qui suggère que le métabolisme hormonal pendant la gestation a permis de reverser le phénomène ou que les souris fertiles ne présentaient pas ce phénotype. Le diagnostic de l'OHSS reposant surtout sur l'échographie, nous envisageons d'utiliser cette technique avec la plateforme d'imagerie du petit animal de Grenoble. Le VEGF semble être le principal médiateur de la perméabilité vasculaire observée chez les femmes traitées en cas de stimulation ovarienne médicalisée et qui développent l'OHSS (McClure, Healy et al. 1994), il est donc probable que ce phénotype œdémateux se développe par l'intermédiaire de la voie VEGF/Flk-1. Ce phénotype n'est pas d'une pénétrance totale, indiquant des différences de susceptibilité interindividuelle entre les souris, qui pourrait expliquer le caractère dynamique ou évolutif des phénotypes au cours de la vie.

En plus des résultats concernant le tractus reproductif femelle, nous avons trouvé que les souris KI présentent spontanément une hyperperméabilité basale et stimulée par VEGF des capillaires de la peau comme observé après injection de Bleu Evans dans la circulation systémique. Ces résultats démontrent qu'en absence du site Y685, les souris sont plus susceptibles et plus sensibles à l'induction de la perméabilité vasculaire suggérant que le site Y685 de la VE-cadhérine pourrait contrôler la restauration de la fonction des jonctions *in vivo* comme *in vitro*. L'analyse de l'état de phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine dans l'ovaire et utérus de la souris VE-Y685F nous a permis de montrer que la VE-cadhérine est toujours phosphorylée au cours du cycle ovarien malgré la mutation sur le site Y685. Donc nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la phosphorylation sur d'autre(s) sites tyrosine(s) soit en faveur d'une perméabilité vasculaire accrue observée chez les souris VE-Y685F. Il est donc concevable que certains sites pourraient favoriser la perméabilité vasculaire alors que d'autres seraient impliqués dans la restauration de l'intégrité des jonctions interendothéliales. Des études futures seront nécessaires pour investiguer l'existence de tels sites phosphorylables de la VE-cadhérine mutée qui seraient en faveur d'une hyper-phosphorylation suite à l'absence du site Y685.

Plusieurs études *in vitro* ont décrit la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine comme un processus corrélé à une augmentation de la perméabilité endothéliale (Andriopoulou, Navarro et al. 1999, Nawroth, Poell et al. 2002, Potter, Barbero et al. 2005, Angelini, Hyun et al. 2006, Wallez, Cand et al. 2007). Cependant un travail récemment publié par Adam et al a montré *in vitro* que la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine induite par la kinase Src n'était pas suffisante pour déclencher l'augmentation de la perméabilité endothéliale. Ceci montre que le sujet est largement débattu (Adam,

Sharenko et al. 2010), cependant l'apport d'une souris KI dans le domaine est source d'informations *in vivo* qui permettra d'alimenter le débat.

II.6 Autres caractéristiques des souris VE-Y685F

II.6.1 Etudes sur le rein

Le rein est un organe endocrine qui régule la tension artérielle par le système rénine-angiotensine et est sous contrôle de la corticosurrénale qui sécrète l'aldostérone, hormone de réabsorption du sodium donc de l'eau. Cet organe très vascularisé comporte un endothélium très fenêtré dont l'homéostasie semble contrôlée par le VEGF dont l'expression a été largement documentée dans cet organe. En effet, le VEGF et son récepteur VEGFR sont fortement exprimés dans le rein dès le développement rénal, mais aussi dans le rein adulte. La vascularisation rénale des souris VE-Y685F et WT a été analysée en collaboration avec l'équipe de C Duplaa à Bordeaux. La technique utilisée repose sur de l'imagerie par tomographie par émission de positons après injection d'un produit de contraste et l'analyse d'images assistée par ordinateur qui permet de reconstruire en trois dimensions le réseau vasculaire d'un organe entier et permet d'acquérir des données quantitatives. La densité et les connections des réseaux des artères rénales des souris sauvages et VE-Y685F ont été comparées. Celles-ci ont présenté un phénotype très marqué avec une diminution de la densité du réseau vasculaire et du branchement des artères comparées aux souris sauvages (Figure II.3A, B, C).

La fonction rénale a été examinée en radiobiologie en suivant la capture de petites molécules telles que le DMSA (dimercaptosuccinic acid) couplé au technétium (^{99m}Tc -DMSA) par le cortex rénal chez les deux types de souris. Les résultats montrent une diminution significative de la prise de ^{99m}Tc -DMSA de 19% chez les femelles VE-Y685F par rapport aux souris sauvages ce qui suggère que la faible densité vasculaire rénale observée pourrait influencer la fonction rénale plutôt chez les femelles KI (Figure II.3D).

Au total, cette analyse préliminaire sur les reins des souris KI semble montrer un défaut d'arborescence vasculaire rénale et une modification de perméabilité suggérant l'implication potentielle de la phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine dans l'artériogénèse ou la stabilité du réseau vasculaire rénal.

A

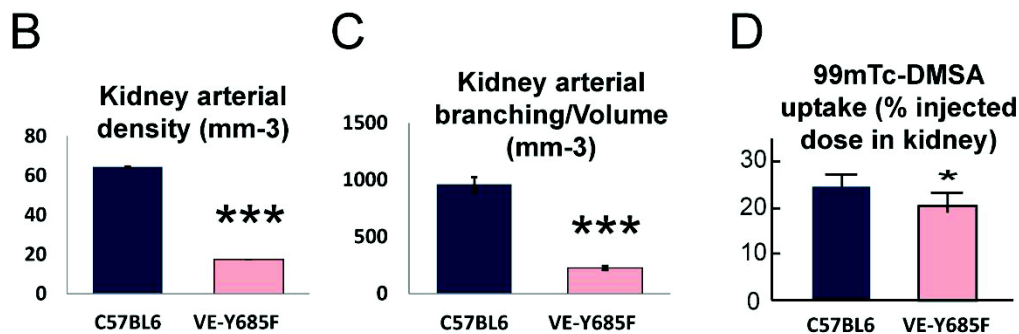
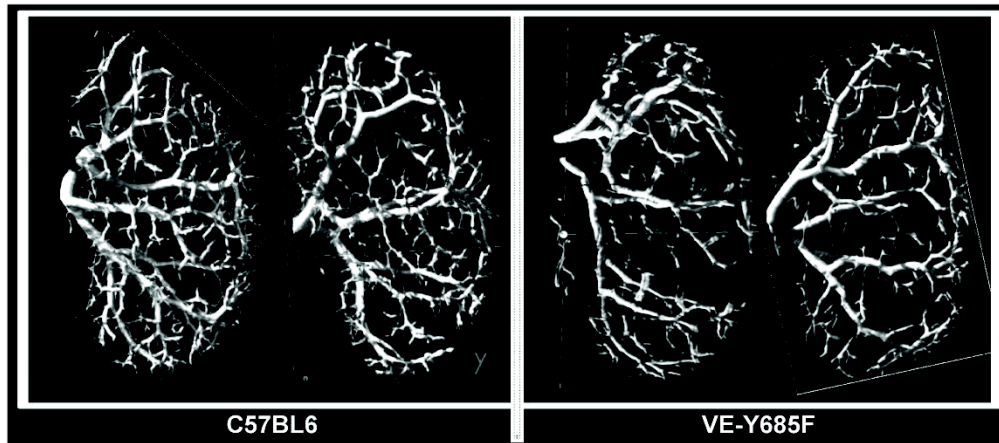


Figure II.1 : Analyse du réseau artériel et la fonction des reins de souris VE-Y685F et sauvages.
*A. Image reconstruite de tomographie par émission de positons des artères rénales des souris femelles VE-Y685F et sauvages. B. Quantification de la densité artérielle ; C. quantification du nombre de branchement des artères ; D. Evaluation de la fonction rénale exprimée comme étant le pourcentage de 99mTc-DMSA capté par le cortex rénal. *: la capture est significativement plus faible chez les souris femelles VE-Y685F ($p < 0,05$)*

II.6.2 Autres caractéristiques

En plus des phénotypes décrits plus haut, les souris knock-in VE-Y685F ont montré des événements plus ou moins marqués dont un qui affecte la rate. En effet, celle-ci a été très souvent retrouvée largement hypertrophiée (Figure II.5A) et ce souvent chez les souris présentant un œdème ovarien. Quelques cas de tumeurs solides ont été observés surtout dans l'utérus (6 cas) i (Figure II.5B). Chez les souris mâles VE-Y685F, le phénotype le plus marqué a été constaté chez les animaux âgés de plus de 15 mois qui présentaient des vésicules séminales hyper-développées et/ou nécrotiques (Figure II.5C). Ce phénotype a été observé chez plus de 80% des souris VE-Y685F mâles de plus de 15 mois alors que seuls quelques rares cas (moins de 10%) ont été observés chez les souris sauvages.

Au total, la mutation du site Y685 de la VE-cadhérine semble conduire à des phénotypes subtiles qui peuvent être différents selon le contexte et l'organe concerné qui sont peut-être en lien avec l'expression générale de VEGF nécessaire à l'homéostasie des réseaux vasculaires de ces mêmes organes .

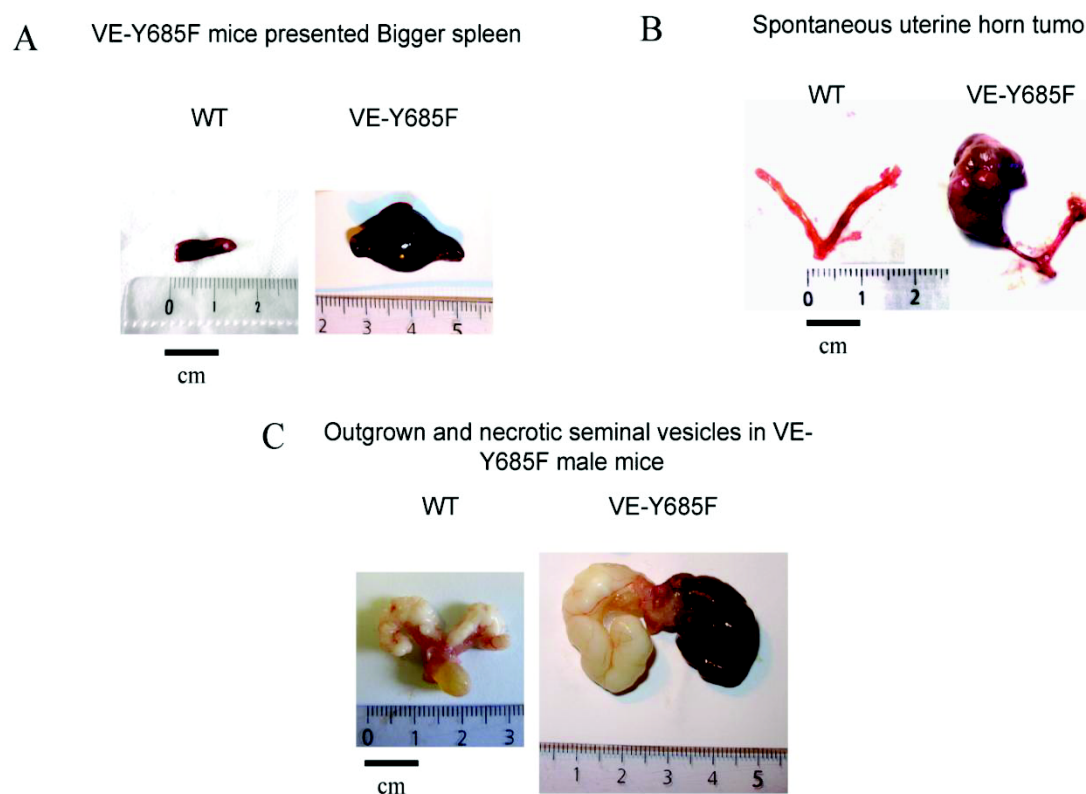


Figure. II.2 : Phénotypes supplémentaires observés chez les souris VE-Y685F. A. Exemple de rate hypertrophiée chez les souris VE-Y685F ; B. Tumeurs utérines de souris femelles VE-Y685F (6 cas observés chez des femelles VE-Y685F de plus d'un an) ; C. hypertrophie et nécrose des glandes séminales observées chez des mâles VE-Y685F

II.6.3 La PR chez les souris VE-Y685F

L'effet de VEGF et du $\text{TNF}\alpha$, étant très important dans la pathogénèse de la PR, il nous est apparu très intéressant d'étudier le développement de la PR chez les souris VE-Y685F. Pour cela deux modèles de PR chez la souris ont été étudiés : un modèle par injection de collagène (CIA) et un modèle par injection d'anticorps arthrogéniques (CAIA).

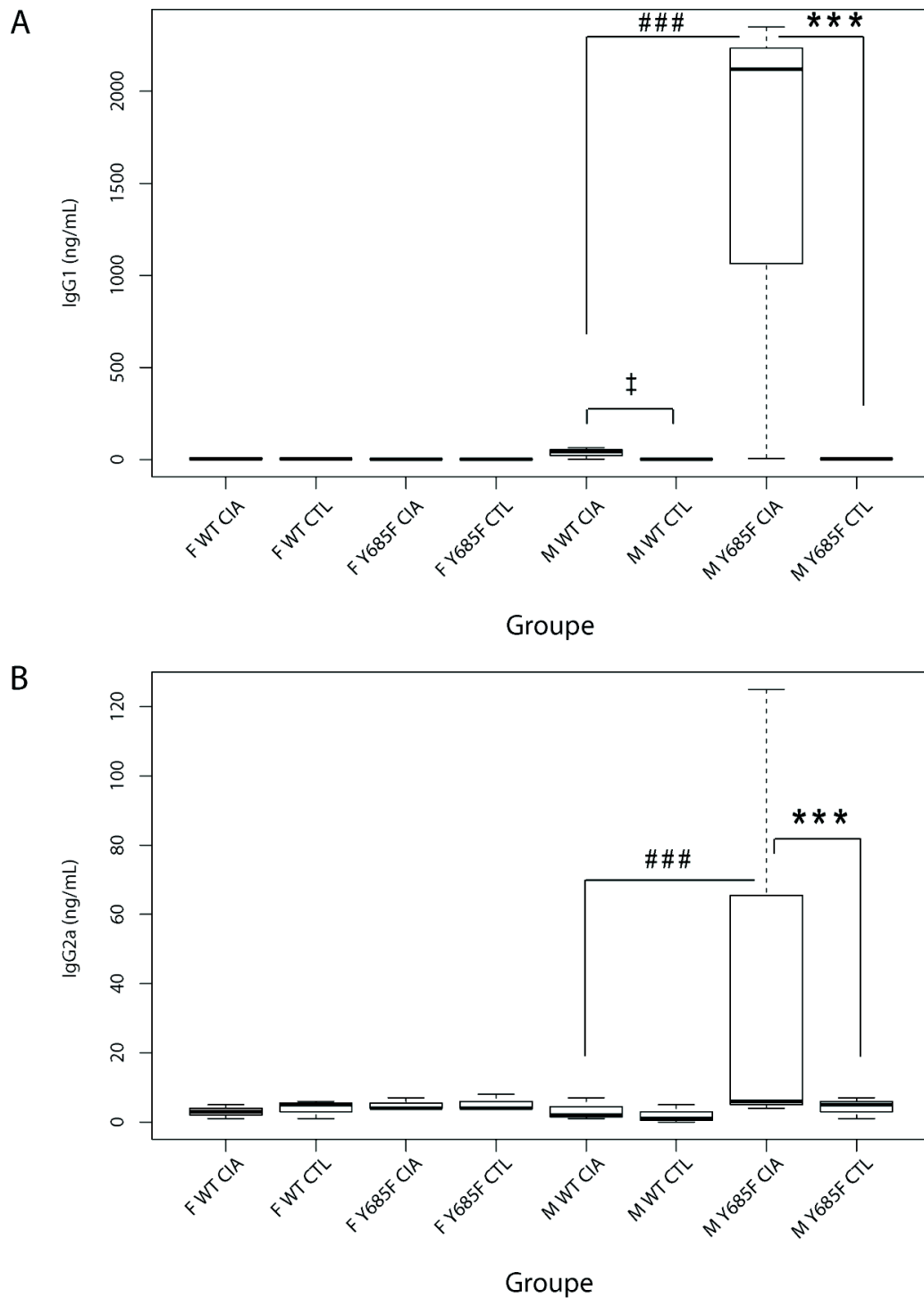


Figure II.3 : Analyse de l'état d'immunisation des souris après traitement au collagène II. A. Niveau d'IgG1 anti-collagène II produit chez les souris traitées et contrôles ; B. Niveau d'IgG2a anti-collagène II produit chez les souris traitées et contrôles ;*: $p < 0,0001$; ‡ : $p < 0,05$; ### : $p < 0,0001$; Chaque groupe est composé de 3 souris**

Le modèle CIA qui se déroule en deux mois ressemble beaucoup à la pathologie humaine et retrace bien les différentes phases du développement de la maladie et est connu pour produire les premières étapes inflammatoires et immunologiques. L'étude a été réalisée à la fois chez des souris mâles et fe-

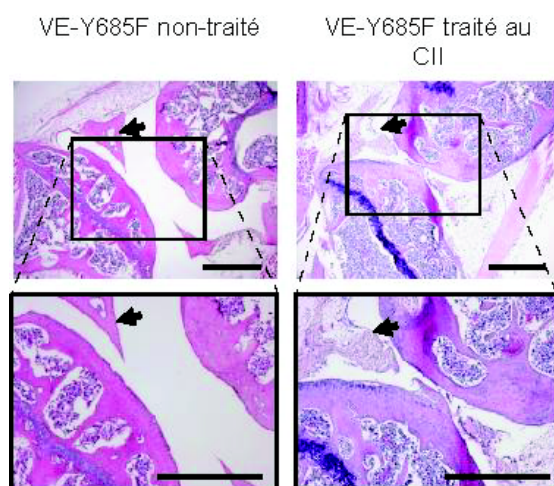


Figure II.4 : Histologie du genou des souris VE-Y685F induite ou non au collagène II. La barre d'échelle vaut 0,06 μ m

nelles en utilisant 8 groupes de souris ($n=3$) qui ont été traitées ou non. Au jour 0, les souris sont injectées avec du PBS (groupe contrôle-CTL) ou une émulsion de collagène II du sternum de poule (1mg/mL) mélangé à l'adjuvant complet de Freund (contenant 2,5 mg/mL *M Tuberculosis*) par voie intradermique à la base de la queue (groupe CIA). Une seconde injection a été effectuée pour toutes les souris 21 jours après la première. Du 10^{ème} au 60^{ème} jour, la taille des articulations des pattes antérieures et postérieures a été mesurée.

Les souris ont été sacrifiées au 60^{ème} jour de traitement, le sang a été collecté et les plasmas ont été analysés pour leur contenu en IgG. L'injection de collagène II déclenche une réaction inflammatoire mesurable par la production d'IgG de sous-type IgG1 et IgG2a anti-collagène II dans le plasma des souris. Les anticorps anti-collagène II plasmatiques permettent donc de déterminer le niveau d'induction de l'arthrite chez la souris sauvage et Y685F induites. Nous avons donc mis au point un test ELISA permettant de déterminer les concentrations en immunoglobulines (IgG) anti-collagène II de sous-classe 1 et 2 dans les plasmas murins. Les souris mâles traitées ont produit des IgG alors que les souris femelles non. Les deux sous-types IgG ont été retrouvés chez les mâles traités et ce de façon plus importante chez les KI (Figure II.3). La quantification montre des taux d'IgG1 bien supérieurs à ceux des IgG2a. En effet, les deux souris VE-Y685F ont produit ~2500 ng/mL d'IgG1 tandis que la seule souris sauvage qui a réagi en a produit ~65 ng/mL. Le traitement a induit chez deux sur trois des mâles VE-Y685F l'apparition d'IgG2a (~150 ng/mL) qui était non détectable chez les souris non-traitées. Par contre dans les mêmes conditions, une seule souris sauvage traitée a montré un titre sérique de 30 ng/mL. Ces résultats suggèrent que dans les mêmes conditions d'induction du CIA, les souris VE-Y685F seraient plus sensibles à l'immunisation que les sauvages. Aucune différence n'a été notée au cours du temps entre la taille des articulations des souris traitées et celle des souris non traitées que ça soit pour les VE-Y685F ou les sauvages dans ce modèle, ce qui suggère que la durée de deux mois a peut-être été trop courte et qu'il eut fallu attendre quelques mois supplémentaires.

L'arthrite rhumatoïde engendre des destructions au niveau articulaire induites par la dégradation enzymatique du collagène articulaire et la prolifération des synoviocytes conduisant à la formation du pannus inter-articulaire. Nous avons analysé l'état des articulations des souris présentant un taux d'IgG élevé. Des coupes histologiques de genou ont été réalisées chez la souris Y685F non-induite et induite CIA après prélèvements des articulations, fixation au formaldéhyde, décalcification avec l'EDTA pendant 6 semaines, inclusion en paraffine. L'induction de l'arthrite induit une destruction sévère des structures inter-articulaires (Figure II.4) avec infiltration et prolifération des synoviocytes qui s'accompagne de la destruction des structures osseuses au niveau de l'épiphyse distale. Ces résultats préliminaires en complément des dosages d'IgG permettent de valider le modèle d'induction CIA et présentent la mutation Y685F comme étant un élément pouvant prédisposer la souris à développer l'arthrite.

Un deuxième modèle d'arthrite plus rapide a été réalisé en utilisant l'administration intraveineuse d'anticorps anti-collagène II aux capacités arthrogéniques. Les injections se déroulent suivant l'enchaînement de séquences : 1) à J0, les souris sont injectées avec 0,5 mg d'anticorps, 2) à J3 les souris sont injectées en intrapéritonéal par du LPS (lipopolysaccharide). Les souris ont été suivies de J0 à J14 pour examiner leurs scores cliniques. Toutes les souris traitées ont présenté un gonflement des pattes au cours du temps détectable à partir de 3 jours de traitement. L'analyse statistique des différences entre les groupes montre une tendance indiquant une plus grande sévérité de l'arthrite chez les VE-Y685F comparées aux sauvages bien que les valeurs chez les deux types de souris soient proches ($p = 0,011$, par ANOVA) (Figure II.5).

Pour les deux types de modèles utilisés, les expériences méritent d'être confortées par une analyse sur

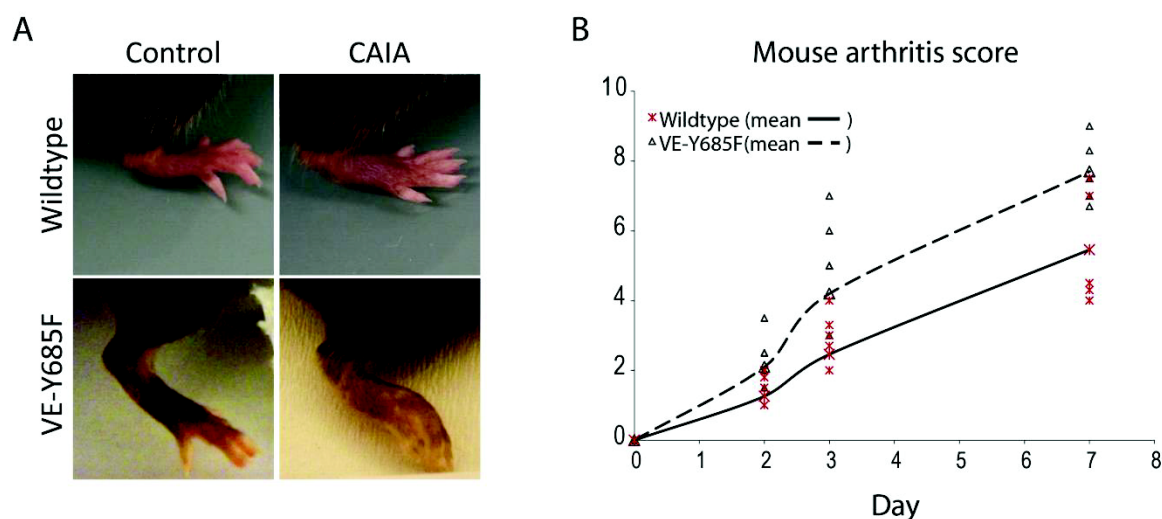


Figure II.5 : A) Aspect macroscopique des pattes des souris WT et VE-Y685F traitées ou non avec les anticorps anti-collagène II arthrogénique ; B) Score clinique de l'arthrite des souris WT et VE-Y685F après induction du modèle CAIA. Les scores sont significativement différents ($p=0,011$, ANOVA)

une plus grande cohorte d'animaux pour pouvoir conclure que la phosphorylation du site Y685 de la VE-cadhérine est plus impliquée dans la régulation des premières étapes de la pathogénèse de la PR comme observé avec le modèle CIA mais ne devrait pas avoir de rôle majeur dans les événements tardifs de dégradation du cartilage induit par le modèle CAIA

II.6.4 VE-cadhérine soluble

Comme présenté dans le chapitre précédent, nous avons démontré que le TNF α induit le clivage de la VE-cadhérine qui nécessite l'activité kinase de Src et que le niveau du fragment soluble libéré corrèle avec l'activité de la maladie chez des patients ayant une PR débutante (Sidibé, Mannic et al. 2012). Dans les modèles murins de PR illustrés précédemment, nous avons recherché la présence de VE-cadherine clivée dans la circulation périphérique de ces souris par analyse en westernblot de fractions aliquotes de plasma. Nous avons pu détecter un fragment immunoréactif d'environ 90 kDa dont le taux est plus élevé après induction de l'arthrite, ce qui est en accord avec les résultats obtenus chez l'humain polyarthritique. De plus, de façon non stimulée, le taux de VE-cadhérine soluble chez les souris KI est plus élevé que chez les souris sauvages. Donc il semblerait que l'absence du site Y685 n'empêche pas le clivage de la VE-cadhérine mais suggère la participation potentielle d'autres sites alternatifs de phosphorylation dans la voie du TNF α qui rendent l'endothélium plus perméable ou fragile. Ce résultat intéressant est en accord avec l'idée que la phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine soit impliquée dans la régulation de la perméabilité vasculaire.

Discussions générales et perspectives de la thèse

La modification des propriétés adhésives de la VE-cadhérine a une implication majeure dans la modulation de la perméabilité endothéliale, et ce par plusieurs processus tels que le clivage de son domaine d'interaction homophile, sa phosphorylation sur tyrosine ainsi que son internalisation. De nombreux médiateurs angiogéniques ou inflammatoires ont été rapportés pour avoir un effet inducteur de l'un de ces processus. Parmi eux, on peut compter plusieurs facteurs de croissance comme le VEGF, ou des facteurs inflammatoires comme le TNF α ainsi que des hormones telles que les œstrogènes. La plupart de ces facteurs sont aussi impliqués dans diverses pathologies comme le VEGF dans les cancers ou le TNF α dans les maladies inflammatoires chroniques comme la PR. Il paraît donc concevable que l'effet de ces cytokines sur les fonctions adhésives de la VE-cadhérine participe au dysfonctionnement de l'endothélium qui apparaît au cours du développement de ces pathologies. L'exemple de la PR est très illustratif pour l'implication des cellules endothéliales dans la pathogénèse d'une maladie inflammatoire et des affections cardiovasculaires associées puisque le dysfonctionnement endothélial est un des événements à l'origine de l'athérogénèse qui participe à la forte morbidité de la PR. Il serait d'un grand intérêt de concevoir des outils permettant d'identifier les atteintes vasculaires précoces chez les patients arthritiques afin de gérer au mieux le traitement de la maladie.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai pu mettre en évidence un nouvel effet non encore décrit du TNF α sur la VE-cadhérine *in vitro* qui est le clivage du domaine extracellulaire soluble de la protéine. Les expériences montrent que le processus de clivage passe par l'activation de la tyrosine kinase Src mais aussi par d'autres kinases activées par le TNF α . Le clivage de la VE-cadhérine nécessite l'action de métalloprotéases telles que MMP-2 par des mécanismes moléculaires reliant Src et les MMPs dont les processus mécanistiques ne sont pas tous éclaircis. Cependant deux hypothèses importantes et distinctes peuvent être émises pour expliquer ce lien. La première est que l'activation de kinases comme Src induit une modification covalente de la VE-cadhérine (phosphorylation) conduisant à un changement conformationnel de la protéine la rendant plus sensible au clivage. La deuxième hypothèse est que l'activation de Src par le TNF α conduise à une libération du calcium qui activerait les MMPs. Cependant nous n'avons pas vu d'augmentation du niveau de MMP-2 sous l'effet de TNF α . Toutefois toutes les deux hypothèses pourraient contribuer au clivage de la VE-cadhérine et la génération subséquente de son fragment extracellulaire soluble. De plus l'analyse de la VE-cadhérine soluble dans le sérum de patients atteints de PR débutante a révélé une corrélation avec l'activité de la maladie indiquant que ce fragment pourrait avoir un grand intérêt en application clinique pour le suivi thérapeutique des patients.

Au delà des résultats obtenus pendant cette thèse, de nouvelles questions abordant plusieurs domaines d'application restent posées :

- En ce qui concerne les cytokines et leur mécanisme d'action sur le clivage de la VE-cadhérine, il serait intéressant de déterminer si toutes les cytokines capables d'induire la perméabilité

vasculaire ont le même effet d'induction de la phosphorylation sur tyrosine et du clivage de la VE-cadhérine *in vitro* et *in vivo* chez la souris ou le rat. Il faudra chercher à départager les deux modèles proposés pour expliquer le lien entre les kinases dont Src et les métalloprotéases de la matrice extracellulaire. Un des points les plus intéressants serait d'identifier le site de clivage de la VE-cadhérine et de chercher à savoir si les cytokines, déjà décrites pour leur capacité d'induire cette modification, provoquent le clivage au même site et si toutes les MMPs peuvent provoquer ce type de coupure. Une fois que le site de clivage serait connu, il sera envisageable de produire des inhibiteurs spécifiques pour empêcher ce processus et voir celui de la perméabilité vasculaire *in vivo*. Cela pourrait avoir un intérêt particulièrement grand dans le traitement de maladie comme le DMLA, l'OHSS, les cancers et la PR.

- Concernant l'intérêt du dosage de VE-cadhérine soluble en application clinique, une nouvelle étude collaborative est déjà en cours entre le service de rhumatologie de la clinique hospitalo-universitaire de Rouen et le laboratoire Biologie du Cancer et de l'infection, dans le but de déterminer s'il représente un marqueur de suivi des biothérapies (anti-TNF α). Ce projet consiste à analyser la VE-cadhérine soluble dans les sérums d'une quarantaine de patients qui fut prélevé à différents moments de biothérapies. Des analyses statistiques seront ensuite réalisées pour déterminer la corrélation entre le titre de la VE-cadhérine soluble et l'activité de la maladie définie par le DAS. Il serait intéressant d'étendre de façon plus large ce dosage à d'autres pathologies autoimmunes ou inflammatoires pour évaluer le caractère prédictif de ce marqueur de l'agression endothéliale.

- Le modèle d'angiogénèse contrôlée dans le tractus reproductif femelle nous a permis d'observer la phosphorylation de la VE-cadhérine sur le site Y685 au cours du cycle ovarien prédominant au stade estrus, indiquant une implication de cette modification de la protéine dans les événements post-ovulatoires tels que l'angiogénèse et/ou la perméabilité associée. Ceci est particulièrement intéressant car il n'y a aucun modèle physiologique et dynamique d'étude de la phosphorylation de la VE-cadhérine *in vivo*, ce qui nous permet de proposer le cycle ovarien de la souris et probablement du rat comme un nouveau modèle d'étude de l'implication de la phosphorylation de la VE-cadhérine ainsi que celle de ses partenaires cytoplasmiques. Un phénotype particulier chez les souris KI (VE-Y685F) puisque 30% d'entre elles présentent une hypertrophie ovarienne et utérine avec un œdème qui est sans doute associé à des problèmes de perméabilité fine observés également sur la face interne de la peau avec une plus grande réponse à une injection locale de VEGF. Ces données toutes nouvelles pourront être approfondies par une analyse de l'ultrastructure des petits capillaires en microscopie électronique réalisable grâce à la plateforme d'imagerie grenobloise qui nous ouvre des opportunités indéniables pour obtenir des compléments d'informations sur la structure des jonctions endothéliales de cette souris KI. Une nouvelle étude est en cours au laboratoire pour étudier le niveau de perméabilité vasculaire dans l'utérus et l'ovaire des souris pendant les différentes phases du cycle, ainsi que l'analyse de VE-cadhérine soluble dans les sérums correspondants aux souris étudiés.

- Le phénotype majoritaire ayant été observé dans un organe endocrine, cela soulève la question de savoir ce qu'il en est des autres organes endocrines où l'expression de VEGF a été large-

ment décrite. Une première analyse sur le rein nous montre que la mutation VE-Y685F provoque une diminution de la densité vasculaire et du nombre de branchement des artères chez les souris femelles suggérant un rôle important de la phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine dans les processus de formation ou de stabilité des vaisseaux dans le rein de ces animaux. De façon intéressante, l'analyse de la fonction rénale des souris femelles VE-Y685F a montré une diminution de 19% indiquant que la faible densité vasculaire notée chez ces souris a un effet clair sur la fonction rénale. Par contre nous n'avons pas détecté de différences dans la fonction rénale entre les mâles VE-Y685F et sauvages. Il serait intéressant d'examiner le réseau vasculaire rénal des souris mâles VE-Y685F pour voir s'il présente la même faible densité que chez les femelles. Ces phénotypes quasi-dépendants de l'organe et éventuellement du sexe pour le rein pourraient s'expliquer par la diversité des médiateurs (facteurs de croissance, hormones...) influençant l'activité des cellules endothéliales, la différence dans la fréquence de leurs expressions et éventuellement les types de vaisseaux affectés dans un organe donné (artères, veines, capillaires etc). Un regard tout particulier devrait être tourné vers l'examen des vaisseaux du rein et d'autres organes endocrines après injection à cœur battant des souris au FITC-dextran, et inclusion et coupes de tissus. Ceci a déjà été réalisé au laboratoire pour l'examen de la vascularisation de la glande surrénale. Une collaboration avec une équipe grenobloise de physiologistes vasculaires est en cours pour évaluer la réactivité de vaisseaux à l'acétylcholine et l'épinéphrine qui devra nous renseigner sur le tonus artériel peut être en lien avec le défaut d'arborisation du système rénal.

- Parmi les anomalies observées sur certains organes, nous avons noté que certaines souris VE-Y685F présentent une hypertrophie de la rate qui a été souvent associée à d'autres phénotypes. Nous avons également observé une hyperréactivité immunitaire dans les modèles de PR chez ces souris KI. Ce phénotype correspond-t-il à une exacerbation du processus inflammatoire et immunologique associé à d'autres anomalies chez les souris VE-Y685F comme chez l'humain où elle est associée à des causes infectieuses, hématologiques et tumorales. Une publication récente montre l'accumulation de monocytes dans la rate capable de participer à la réparation tissulaire (Swirski, Nahrendorf et al. 2009) La possibilité de séparer les cellules de la rate et de les identifier par tri pourra être réalisée. Chez les souris mâles VE-Y685F très âgés (15 mois et plus), c'est une hypertrophie des vésicules séminales avec de la nécrose associée qui a été notée alors que chez les femelles des tumeurs utérines ont été dénombrées. Afin de déterminer le potentiel de ces souris à développer une angiogénèse tumorale, la plateforme d'imagerie de Grenoble nous donnera aussi l'opportunité de pouvoir réaliser l'analyse en imagerie fonctionnelle dans un autre modèle d'angiogénèse qui est celle développée par implantation d'éponges sous la peau contenant des facteurs de croissance comme le FGF-2

- Nous sommes au début de la caractérisation du phénotype des souris VE-Y685F, qui semble subtile et pour lequel les explications moléculaires sont pour l'heure manquantes. Au delà des expériences *in vivo*, nous pensons réaliser des études *in vitro*. Une étude systématique va donc être entreprise à partir de cellules endothéliales isolées de poumon des souris VE-Y685F. Ceci permettra d'étudier les propriétés des cellules possédant la VE-cadhérine mutée dans des tests de prolifération,

migration et perméabilité cellulaire. L'association ou la dissociation de la VE-cadhérine avec ses partenaires cytoplasmiques ont été rapportées pour moduler la force des jonctions endothéliales, la survie et la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* (Potter, Barbero et al. 2005, Wallez, Vilgrain et al. 2006, Broermann, Winderlich et al. 2011). Des expériences de signalisation cellulaire pour déterminer les partenaires de la VE-cadhérine (Src, Flk-1...) de même que la réponse de ces cellules à VEGF *in vitro* seront réalisées. La détermination d'autres sites de phosphorylation de la VE-cadhérine pourra être réalisée en réponse à VEGF et à TNF α .

Au total, nos données originales ouvrent des portes à des champs d'investigation assez larges pour la phosphorylation de la VE-cadhérine dans la physiologie et physiopathologie vasculaire.

Références bibliographiques :

Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert and R. Kemler (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." EMBO J **16**(13): 3797-3804.

Aberle, H., S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler and H. Hoschuetzky (1994). "Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins." J Cell Sci **107 (Pt 12)**: 3655-3663.

Abu-Ghazaleh, R., J. Kabir, H. Jia, M. Lobo and I. Zachary (2001). "Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells." Biochem J **360**(Pt 1): 255-264.

Adam, A. P., A. L. Sharenko, K. Pumiglia and P. A. Vincent (2010). "Src-induced tyrosine phosphorylation of VE-cadherin is not sufficient to decrease barrier function of endothelial monolayers." J Biol Chem **285**(10): 7045-7055.

Adams, R. H. and K. Alitalo (2007). "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(6): 464-478.

Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-756.

Aird, W. (2007). "Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium I. Structure, Function, and Mechanisms." Circulation Research **100**(2): 158-173.

Aletaha, D., T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, B. Combe, K. H. Costenbader, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J. M. Hazes, K. Hobbs, T. W. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T. K. Kvien, T. Laing, P. Mease, H. A. Ménard, L. W. Moreland, R. L. Naden, T. Pincus, J. S. Smolen, E. Stanislawska-Biernat, D. Symmons, P. P. Tak, K. S. Upchurch, J. Vencovský, F. Wolfe and G. Hawker (2010). "2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative." Arthritis Rheum **62**(9): 2569-2581.

Alexander, J. S., W. F. Patton, B. W. Christman, L. L. Cuiper and F. R. Haselton (1998). "Platelet-derived lysophosphatidic acid decreases endothelial permeability in vitro." Am J Physiol **274**(1 Pt 2): H115-122.

Ali, J., F. Liao, E. Martens and W. A. Muller (1997). "Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin): cloning and role in endothelial cell-cell adhesion." Microcirculation **4**(2): 267-277.

Allingham, M. J., J. D. van Buul and K. Burrridge (2007). "ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration." J Immunol **179**(6): 4053-4064.

Alvarez, A., M. Cerdá-Nicolás, Y. Naim Abu Nabah, M. Mata, A. C. Issekutz, J. Panés, R. R. Lobb and M. J. Sanz (2004). "Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II." Blood **104**(2): 402-408.

Anastasiadis, P. Z. (2007). "p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases." Biochim Biophys Acta **1773**(1): 34-46.

Anastasiadis, P. Z. and A. B. Reynolds (2000). "The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer." J Cell Sci **113** (Pt 8): 1319-1334.

Anderson, J. M. and C. M. Van Itallie (2009). "Physiology and Function of the Tight Junction." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **1**(2).

Andriopoulou, P., P. Navarro, A. Zanetti, M. G. Lampugnani and E. Dejana (1999). "Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(10): 2286-2297.

Angelini, D. J., S. W. Hyun, D. N. Grigoryev, P. Garg, P. Gong, I. S. Singh, A. Passaniti, J. D. Hasday and S. E. Goldblum (2006). "TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **291**(6): L1232-1245.

Angst, B. D., C. Marozzi and A. I. Magee (2001). "The cadherin superfamily: diversity in form and function." J Cell Sci **114**(Pt 4): 629-641.

Antonetti, D. A., A. J. Barber, L. A. Hollinger, E. B. Wolpert and T. W. Gardner (1999). "Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors." J Biol Chem **274**(33): 23463-23467.

Arany, Z., S.-Y. Foo, Y. Ma, J. L. Ruas, A. Bommi-Reddy, G. Girnun, M. Cooper, D. Laznik, J. Chinsomboon, S. M. Rangwala, K. H. Baek, A. Rosenzweig and B. M. Spiegelman (2008). "HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1[agr]." Nature **451**(7181): 1008-1012.

Arend, W. P., M. Malyak, C. J. Guthridge and C. Gabay (1998). "Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology." Annu Rev Immunol **16**: 27-55.

Armant, M. A. and M. J. Fenton (2002). "Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals." Genome Biol **3**(8): REVIEWS3011.

Augustin, H. G., D. H. Kozian and R. C. Johnson (1994). "Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes." Bioessays **16**(12): 901-906.

Aurrand-Lions, M., L. Duncan, C. Ballestrem and B. A. Imhof (2001). "JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells." J Biol Chem **276**(4): 2733-2741.

Balasch, J., F. Fábregues and V. Arroyo (1998). "Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a new insight into the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome." Hum Reprod **13**(10): 2718-2730.

Barber, A. J. and D. A. Antonetti (2003). "Mapping the blood vessels with paracellular permeability in the retinas of diabetic rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(12): 5410-5416.

Baumeister, U., R. Funke, K. Ebnet, H. Vorschmitt, S. Koch and D. Vestweber (2005). "Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation." EMBO J **24**(9): 1686-1695.

Bazzoni, G. (2006). "Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall." Thromb Haemost **95**(1): 36-42.

Bazzoni, G. and E. Dejana (2004). "Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis." Physiol Rev **84**(3): 869-901.

Behzadian, M. A., L. J. Windsor, N. Ghaly, G. Liou, N. T. Tsai and R. B. Caldwell (2003). "VEGF-induced paracellular permeability in cultured endothelial cells involves urokinase and its receptor." FASEB J **17**(6): 752-754.

Beller, T. C., A. Maekawa, D. S. Friend, K. F. Austen and Y. Kanaoka (2004). "Targeted gene disruption reveals the role of the cysteinyl leukotriene 2 receptor in increased vascular permeability and in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice." Journal of Biological Chemistry **279**(44): 46129-46134.

Bendele, A. (2001). "Animal models of rheumatoid arthritis." J Musculoskelet Neuronal Interact **1**(4): 377-385.

Bendele, A., J. McComb, T. Gould, T. McAbee, G. Sennello, E. Chlipala and M. Guy (1999). "Animal models of arthritis: relevance to human disease." Toxicol Pathol **27**(1): 134-142.

Bibert, S., H. Ayari, D. Riveline, E. Concord, B. Hermant, T. Vernet and D. Gulino-Debrac (2008). "Establishment of cell-cell junctions depends on the oligomeric states of VE-cadherin." J Biochem **143**(6): 821-832.

Bibert, S., M. Jaquinod, E. Concord, C. Ebel, E. Hewat, C. Vanbelle, P. Legrand, M. Weidenhaupt, T. Vernet and D. Gulino-Debrac (2002). "Synergy between extracellular modules of vascular endothelial cadherin promotes homotypic hexameric interactions." J Biol Chem **277**(15): 12790-12801.

Blankestijn, W. M., M. E. van Gijn, Y. P. Essers-Janssen, M. J. Daemen and J. F. Smits (2000). "Beta-catenin, an inducer of uncontrolled cell proliferation and migration in

malignancies, is localized in the cytoplasm of vascular endothelium during neovascularization after myocardial infarction." Am J Pathol **157**(3): 877-883.

Bradfield, P. F., C. Scheiermann, S. Nourshargh, C. Ody, F. W. Luscinskas, G. E. Rainger, G. B. Nash, M. Miljkovic-Licina, M. Aurrand-Lions and B. A. Imhof (2007). "JAM-C regulates unidirectional monocyte transendothelial migration in inflammation." Blood **110**(7): 2545-2555.

Breier, G., F. Breviario, L. Caveda, R. Berthier, H. Schnürc, U. Gotsch, D. Vestweber, W. Risau and E. Dejana (1996). "Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system." Blood **87**(2): 630-641.

Breviario, F., L. Caveda, M. Corada, I. Martin-Padura, P. Navarro, J. Golay, M. Introna, D. Gulino, M. G. Lampugnani and E. Dejana (1995). "Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(8): 1229-1239.

Broermann, A., M. Winderlich, H. Block, M. Frye, J. Rossaint, A. Zarbock, G. Cagna, R. Linnepe, D. Schulte, A. F. Nottebaum, D. Vestweber, A. Broermann, M. Winderlich, H. Block, M. Frye, J. Rossaint, A. Zarbock, G. Cagna, R. Linnepe, D. Schulte, A. F. Nottebaum and D. Vestweber (2011). "Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo." The Journal of Experimental Medicine **208**(12): 2393-2401.

Brown, L. F., A. M. Dvorak and H. F. Dvorak (1989). "LEAKY VESSELS, FIBRIN DEPOSITION, AND FIBROSIS - A SEQUENCE OF EVENTS COMMON TO SOLID TUMORS AND TO MANY OTHER TYPES OF DISEASE." American Review of Respiratory Disease **140**(4): 1104-1107.

Burns, A. R., C. W. Smith and D. C. Walker (2003). "Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung." Physiol Rev **83**(2): 309-336.

Burri, P. H. and V. Djonov (2002). "Intussusceptive angiogenesis--the alternative to capillary sprouting." Mol Aspects Med **23**(6S): S1-27.

Bussolino, F., G. Serini, S. Mitola, G. Bazzoni and E. Dejana (2001). "Dynamic modules and heterogeneity of function: a lesson from tyrosine kinase receptors in endothelial cells." EMBO Rep **2**(9): 763-767.

Butcher, R. L., W. E. Collins and N. W. Fugo (1974). "Plasma Concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 β Throughout the 4-Day Estrous Cycle of the Rat." Endocrinology **94**(6): 1704-1708.

Buteau-Lozano, H., M. Ancelin, B. Lardeux, J. Milanini and M. Perrot-Applanat (2002). "Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Estradiol and

Tamoxifen in Breast Cancer Cells A Complex Interplay between Estrogen Receptors α and β ." Cancer Research **62**(17): 4977-4984.

Caduff, J. H., L. C. Fischer and P. H. Burri (1986). "Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung." Anat Rec **216**(2): 154-164.

Carden, D., F. Xiao, C. Moak, B. H. Willis, S. Robinson-Jackson and S. Alexander (1998). "Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins." Am J Physiol **275**(2 Pt 2): H385-392.

Carli, P., C. Landais, M. Aletti, J. M. Cournac, E. Poisnel and J. F. Paris (2009). "[Current treatment of rheumatoid arthritis]." Rev Med Interne **30**(12): 1067-1079.

Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeijt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoek, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau and A. Nagy (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." Nature **380**(6573): 435-439.

Carmeliet, P., M. G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, B. Oosthuysen, M. Dewerchin, A. Zanetti, A. Angellilo, V. Mattot, D. Nuyens, E. Lutgens, F. Clotman, M. C. de Ruiter, A. Gittenberger-de Groot, R. Poelmann, F. Lupu, J. M. Herbert, D. Collen and E. Dejana (1999). "Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis." Cell **98**(2): 147-157.

Carmeliet, P. and E. Storkebaum (2002). "Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system: implications for neurological disorders." **13**(1): 39-53.

Cattellino, A., S. Liebner, R. Gallini, A. Zanetti, G. Balconi, A. Corsi, P. Bianco, H. Wolburg, R. Moore, B. Oreda, R. Kemler and E. Dejana (2003). "The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility." J Cell Biol **162**(6): 1111-1122.

Cavallaro, U., S. Liebner and E. Dejana (2006). "Endothelial cadherins and tumor angiogenesis." Exp Cell Res **312**(5): 659-667.

Caveda, L., I. Martin-Padura, P. Navarro, F. Breviario, M. Corada, D. Gulino, M. G. Lampugnani and E. Dejana (1996). "Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin)." J Clin Invest **98**(4): 886-893.

Cera, M. R., A. Del Prete, A. Vecchi, M. Corada, I. Martin-Padura, T. Motoike, P. Tonetti, G. Bazzoni, W. Vermi, F. Gentili, S. Bernasconi, T. N. Sato, A. Mantovani and E. Dejana (2004). "Increased DC trafficking to lymph nodes and contact hypersensitivity in junctional adhesion molecule-A-deficient mice." J Clin Invest **114**(5): 729-738.

Cereijido, M., J. Valdés, L. Shoshani and R. G. Contreras (1998). "Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity." Annu Rev Physiol **60**: 161-177.

Chakraborty, I., S. K. Das and S. K. Dey (1995). "Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation." J Endocrinol **147**(2): 339-352.

Chartier, N. T., C. I. Oddou, M. G. Lainé, B. Ducarouge, C. A. Marie, M. R. Block and M. R. Jacquier-Sarlin (2007). "Cyclin-dependent kinase 2/cyclin E complex is involved in p120 catenin (p120ctn)-dependent cell growth control: a new role for p120ctn in cancer." Cancer Res **67**(20): 9781-9790.

Chen, C. D., S. U. Chen and Y. S. Yang (2012). "Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.

Chervin-Pétinot, A., M. Courçon, S. Almagro, A. Nicolas, A. Grichine, D. Grunwald, M. H. Prandini, P. Huber and D. Gulino-Debrac (2012). "Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) interacts with α -catenin and actin filaments in endothelial cells and stabilizes vascular capillary network in vitro." J Biol Chem **287**(10): 7556-7572.

Chiba, H., M. Osanai, M. Murata, T. Kojima and N. Sawada (2008). "Transmembrane proteins of tight junctions." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 588-600.

Chintalgattu, V., D. M. Nair and L. C. Katwa (2003). "Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR." **35**(3): 277–286.

Corada, M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M. G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D. M. McDonald, P. A. Ward and E. Dejana (1999). "Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(17): 9815-9820.

Cotran, R. S. and J. S. Pober (1990). "Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury." J Am Soc Nephrol **1**(3): 225-235.

Coultas, L., K. Chawengsaksophak and J. Rossant (2005). "Endothelial cells and VEGF in vascular development." Nature **438**(7070): 937-945.

Courtenay, J. S., M. J. Dallman, A. D. Dayan, A. Martin and B. Mosedale (1980). "Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice." Nature **283**(5748): 666-668.

Crivellato, E., B. Nico, A. Vacca, V. Djonov, M. Presta and D. Ribatti (2004). "Recombinant human erythropoietin induces intussusceptive microvascular growth in vivo." Leukemia **18**(2): 331-336.

Crowson, C. S., P. J. Nicola, H. M. Kremers, W. M. O'Fallon, T. M. Therneau, S. J. Jacobsen, V. L. Roger, K. V. Ballman and S. E. Gabriel (2005). "How much of the increased incidence of heart failure in rheumatoid arthritis is attributable to traditional cardiovascular risk factors and ischemic heart disease?" Arthritis Rheum **52**(10): 3039-3044.

Daniel, J. M. (2007). "Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso." Biochim Biophys Acta **1773**(1): 59-68.

Daniel, J. M. and A. B. Reynolds (1999). "The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor." Mol Cell Biol **19**(5): 3614-3623.

De Bandt, M., M. H. Ben Mahdi, V. Ollivier, M. Grossin, M. Dupuis, M. Gaudry, P. Bohlen, K. E. Lipson, A. Rice, Y. Wu, M. A. Gougerot-Pocidalo and C. Pasquier (2003). "Blockade of vascular endothelial growth factor receptor I (VEGF-RI), but not VEGF-RII, suppresses joint destruction in the K/BxN model of rheumatoid arthritis." J Immunol **171**(9): 4853-4859.

de Vries, C., J. A. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, N. Ferrara and L. T. Williams (1992). "The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor." Science **255**(5047): 989-991.

Deckers, M. M. L., M. Karperien, C. van der Bent, T. Yamashita, S. E. Papapoulos and C. W. G. M. Löwik (2000). "Expression of Vascular Endothelial Growth Factors and Their Receptors during Osteoblast Differentiation." Endocrinology **141**(5): 1667-1674.

Dejana, E., M. Corada and M. G. Lampugnani (1995). "Endothelial cell-to-cell junctions." FASEB J **9**(10): 910-918.

Dejana, E. and C. Giampietro (2012). "Vascular endothelial-cadherin and vascular stability." Curr Opin Hematol **19**(3): 218-223.

Dejana, E., F. Orsenigo and M. G. Lampugnani (2008). "The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability." J Cell Sci **121**(Pt 13): 2115-2122.

DeLisser, H. M., P. J. Newman and S. M. Albelda (1994). "Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31." Immunol Today **15**(10): 490-495.

Dessein, P. H., B. I. Joffe and S. Singh (2005). "Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **7**(3): R634-643.

Devin, A., Y. Lin and Z. Liu (2003). The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. EMBO Rep. **4**: 623-627.

Dinarelli, C. A., J. G. Cannon, S. M. Wolff, H. A. Bernheim, B. Beutler, A. Cerami, I. S. Figari, M. A. Palladino and J. V. O'Connor (1986). "Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1." J Exp Med **163**(6): 1433-1450.

Djonov, V. G., H. Kurz and P. H. Burri (2002). "Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism." Dev Dyn **224**(4): 391-402.

Dobrovolskaia, M. A. and S. N. Vogel (2002). "Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS." Microbes Infect **4**(9): 903-914.

Doerschuk, C. M. (2001). "Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs." Microcirculation **8**(2): 71-88.

Donners, M. M., I. M. Wolfs, S. Olieslagers, Z. Mohammadi-Motahhari, V. Tchaikovski, S. Heeneman, J. D. van Buul, V. Caolo, D. G. Molin, M. J. Post and J. Waltenberger (2010). "A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in angiogenesis and is associated with atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(11): 2188-2195.

Duan, L. J., A. Imamoto and G. H. Fong (2004). "Dual roles of the C-terminal Src kinase (Csk) during developmental vascularization." Blood **103**(4): 1370-1372.

Duarte, A., M. Hirashima, R. Benedito, A. Trindade, P. Diniz, E. Bekman, L. Costa, D. Henrique and J. Rossant (2004). "Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development." Genes Dev **18**(20): 2474-2478.

Dudek, S. M., S. M. Camp, E. T. Chiang, P. A. Singleton, P. V. Usatyuk, Y. Zhao, V. Natarajan and J. G. Garcia (2007). "Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by FTY720 does not require the S1P1 receptor." Cell Signal **19**(8): 1754-1764.

Dudek, S. M., J. R. Jacobson, E. T. Chiang, K. G. Birukov, P. Wang, X. Zhan and J. G. Garcia (2004). "Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by sphingosine 1-phosphate: roles for cortactin and myosin light chain kinase." J Biol Chem **279**(23): 24692-24700.

Dvorak, H. (1986). "Tumors: Wounds That Do Not Heal —." New England Journal of Medicine **315**: 1650-1659.

Ebnet, K., M. Aurrand-Lions, A. Kuhn, F. Kiefer, S. Butz, K. Zander, M. K. Meyer zu Brickwedde, A. Suzuki, B. A. Imhof and D. Vestweber (2003). "The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity." J Cell Sci **116**(Pt 19): 3879-3891.

Eichmann, A., T. Makinen and K. Alitalo (2005). "Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation." Genes Dev **19**(9): 1013-1021.

Eliceiri, B. P., R. Paul, P. L. Schwartzberg, J. D. Hood, J. Leng and D. A. Cheresh (1999). "Selective Requirement for Src Kinases during VEGF-Induced Angiogenesis and Vascular Permeability." Mol. Cell **4**: 915-924.

Emery, P. (2002). "Evidence supporting the benefit of early intervention in rheumatoid arthritis." J Rheumatol Suppl **66**: 3-8.

Eppihimer, M. J., B. Wolitzky, D. C. Anderson, M. A. Labow and D. N. Granger (1996). "Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo." Circ Res **79**(3): 560-569.

Eriksson, E. E., E. Karlof, K. Lundmark, P. Rotzius, U. Hedin and X. Xie (2005). "Powerful inflammatory properties of large vein endothelium in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(4): 723-728.

Esser, S., M. G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana and W. Risau (1998). "Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells." J Cell Sci **111** (Pt 13): 1853-1865.

Esser, S., K. Wolburg, H. Wolburg, G. Breier, T. Kurzchalia and W. Risau (1998). "Vascular Endothelial Growth Factor Induces Endothelial Fenestrations In Vitro." The Journal of Cell Biology **140**(4): 947-959.

Fan, X., S. Krieg, C. J. Kuo, S. J. Wiegand, M. Rabinovitch, M. L. Druzin, R. M. Brenner, L. C. Giudice and N. R. Nayak (2012). "VEGF blockade inhibits angiogenesis and reepithelialization of endometrium." The FASEB Journal **22**(10): 3571-3580.

Feng, D., J. A. Nagy, H. F. Dvorak and A. M. Dvorak (2002). "Ultrastructural studies define soluble macromolecular, particulate, and cellular transendothelial cell pathways in venules, lymphatic vessels, and tumor-associated microvessels in man and animals." Microsc Res Tech **57**(5): 289-326.

Feng, D., J. A. Nagy, J. Hipp, K. Pyne, H. F. Dvorak and A. M. Dvorak (1997). "Reinterpretation of endothelial cell gaps induced by vasoactive mediators in guinea-pig, mouse and rat: many are transcellular pores." J Physiol **504** (Pt 3): 747-761.

Ferrara, N. (1999). "Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis." Kidney Int **56**(3): 794-814.

Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan and M. W. Moore (1996). "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." Nature **380**(6573): 439-442.

Ferrara, N., H. Chen, T. Davis-Smyth, H. P. Gerber, T. N. Nguyen, D. Peers, V. Chisholm, K. J. Hillan and R. H. Schwall (1998). "Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis." Nat Med **4**(3): 336-340.

Ferrara, N., H.-P. Gerber and J. LeCouter (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-676.

Feuerhake, F., G. Füchsl, R. Bals and U. Welsch (1998). "Expression of inducible cell adhesion molecules in the normal human lung: immunohistochemical study of their distribution in pulmonary blood vessels." Histochem Cell Biol **110**(4): 387-394.

Fischer, A., N. Schumacher, M. Maier, M. Sendtner and M. Gessler (2004). "The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development." Genes Dev **18**(8): 901-911.

Flamme, I., G. Breier and W. Risau (1995). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo." Dev Biol **169**(2): 699-712.

Fleischmann, R. M., J. Schechtman, R. Bennett, M. L. Handel, G. R. Burmester, J. Tesser, D. Modafferi, J. Poulakos and G. Sun (2003). "Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: A large, international, multicenter, placebo-controlled trial." Arthritis Rheum **48**(4): 927-934.

Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med **1**(1): 27-31.

Frame, M. C. (2002). "Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour." Biochim Biophys Acta **1602**(2): 114-130.

Fraser, H. M., S. E. Dickson, S. F. Lunn, C. Wulff, K. D. Morris, V. A. Carroll and R. Bicknell (2000). "Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor." Endocrinology **141**(3): 995-1000.

Friedl, J., M. Puhlmann, D. L. Bartlett, S. K. Libutti, E. N. Turner, M. F. Gnant and H. R. Alexander (2002). "Induction of permeability across endothelial cell monolayers by tumor necrosis factor (TNF) occurs via a tissue factor-dependent mechanism: relationship between the procoagulant and permeability effects of TNF." Blood **100**(4): 1334-1339.

Fritsch, R., D. Eselböck, K. Skriner, B. Jahn-Schmid, C. Scheinecker, B. Bohle, M. Tohidast-Akrad, S. Hayer, J. Neumüller, S. Pinol-Roma, J. S. Smolen and G. Steiner (2002). "Characterization of autoreactive T cells to the autoantigens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 (RA33) and filaggrin in patients with rheumatoid arthritis." J Immunol **169**(2): 1068-1076.

Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto and S. Tsukita (1998). "Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin." J Cell Biol **141**(7): 1539-1550.

Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura and S. Tsukita (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." J Cell Biol **123**(6 Pt 2): 1777-1788.

Furuse, M. and S. Tsukita (2006). "Claudins in occluding junctions of humans and flies." Trends Cell Biol **16**(4): 181-188.

Gale, N. W. and G. D. Yancopoulos (1999). "Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development." Genes Dev **13**(9): 1055-1066.

Gamble, J. R., J. Drew, L. Trezise, A. Underwood, M. Parsons, L. Kasminkas, J. Rudge, G. Yancopoulos and M. A. Vadas (2000). "Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions." Circ Res **87**(7): 603-607.

Garcia, J. G., F. Liu, A. D. Verin, A. Birukova, M. A. Dechert, W. T. Gerthoffer, J. R. Bamberg and D. English (2001). "Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement." J Clin Invest **108**(5): 689-701.

Gavard, J. and J. S. Gutkind (2006). "VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the [beta]-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin." Nat Cell Biol **8**(11): 1223-1234.

Genovese, M. C., J. C. Becker, M. Schiff, M. Luggen, Y. Sherrer, J. Kremer, C. Birbara, J. Box, K. Natarajan, I. Nuamah, T. Li, R. Aranda, D. T. Hagerty and M. Dougados (2005). "Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition." N Engl J Med **353**(11): 1114-1123.

Gentil-dit-Maurin, A., S. Oun, S. Almagro, S. Bouillot, M. Courçon, R. Linnepe, D. Vestweber, P. Huber and E. Tillet (2010). "Unraveling the distinct distributions of VE- and N-cadherins in endothelial cells: a key role for p120-catenin." Exp Cell Res **316**(16): 2587-2599.

Gerber, H. P., A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, B. A. Keyt, V. Dixit and N. Ferrara (1998). "Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation." J Biol Chem **273**(46): 30336-30343.

Gerhardt, H., M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima and C. Betsholtz (2003). "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia." J Cell Biol **161**(6): 1163-1177.

Gerhardt, H., C. Ruhrberg, A. Abramsson, H. Fujisawa, D. Shima and C. Betsholtz (2004). "Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system." Dev Dyn **231**(3): 503-509.

Gerhardt, H., H. Wolburg and C. Redies (2000). "N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken." Dev Dyn **218**(3): 472-479.

Gerszten, R. E., J. Chen, M. Ishii, K. Ishii, L. Wang, T. Nanevich, C. W. Turck, T. K. Vu and S. R. Coughlin (1994). "Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface." Nature **368**(6472): 648-651.

Gillrie, M. R., G. Krishnegowda, K. Lee, A. G. Buret, S. M. Robbins, S. Looareesuwan, D. C. Gowda and M. Ho (2007). "Src-family kinase dependent disruption of endothelial barrier function by Plasmodium falciparum merozoite proteins." Blood **110**(9): 3426-3435.

Gimbrone, M. A., R. H. Aster, R. S. Cotran, J. Corkery, J. H. Jandl and J. Folkman (1969). "Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium." Nature **222**(5188): 33-36.

Gingras, D., S. Lamy and R. Béliveau (2000). "Tyrosine phosphorylation of the vascular endothelial-growth-factor receptor-2 (VEGFR-2) is modulated by Rho proteins." Biochem J **348 Pt 2**: 273-280.

Goldblum, S. E., B. Hennig, M. Jay, K. Yoneda and C. J. McClain (1989). "Tumor necrosis factor alpha-induced pulmonary vascular endothelial injury." Infect Immun **57**(4): 1218-1226.

González-Mariscal, L., R. Tapia and D. Chamorro (2008). "Crosstalk of tight junction components with signaling pathways." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 729-756.

Gory-Faure, S., M. H. Prandini, H. Pointu, V. Roullot, I. Pignot-Paintrand, M. Vernet and P. Huber (1999). "Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis." Development **126**(10): 2093-2102.

Gottenberg, J. E., P. Ravaud, T. Bardin, P. Cacoub, A. Cantagrel, B. Combe, M. Dougados, R. M. Flipo, B. Godeau, L. Guillevin, X. Le Loët, E. Hachulla, T. Schaeffer, J. Sibilia, G. Baron, X. Mariette and A. a. R. r. a. F. S. o. Rheumatology (2010). "Risk factors for severe infections in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab in the autoimmunity and rituximab registry." Arthritis Rheum **62**(9): 2625-2632.

Grazia Lampugnani, M., A. Zanetti, M. Corada, T. Takahashi, G. Balconi, F. Breviario, F. Orsenigo, A. Cattelino, R. Kemler, T. O. Daniel and E. Dejana (2003). "Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148." J Cell Biol **161**(4): 793-804.

Groten, T., A. A. Pierce, A. C. Huen and H. W. Schnaper (2005). "17 beta-estradiol transiently disrupts adherens junctions in endothelial cells." FASEB J **19**(10): 1368-1370.

Gu, C., E. R. Rodriguez, D. V. Reimert, T. Shu, B. Fritzsche, L. J. Richards, A. L. Kolodkin and D. D. Ginty (2003). "Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development." Dev Cell **5**(1): 45-57.

Guaquil, V., S. Swendeman, T. Yoshida, S. Chavala, P. A. Campochiaro and C. P. Blobel (2009). "ADAM9 is involved in pathological retinal neovascularization." Mol Cell Biol **29**(10): 2694-2703.

Gupta, S., H. Zhu, L. I. Zon and T. Evans (2006). "BMP signaling restricts hemato-vascular development from lateral mesoderm during somitogenesis." Development **133**(11): 2177-2187.

Gómez, R., C. Simón, J. Remohí and A. Pellicer (2002). "Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade." Endocrinology **143**(11): 4339-4348.

Harhaj, N. S. and D. A. Antonetti (2004). "Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology." Int J Biochem Cell Biol **36**(7): 1206-1237.

Harhaj, N. S., E. A. Felinski, E. B. Wolpert, J. M. Sundstrom, T. W. Gardner and D. A. Antonetti (2006). "VEGF activation of protein kinase C stimulates occludin phosphorylation and contributes to endothelial permeability." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(11): 5106-5115.

Harrison, S. C. (2003). "Variation on an Src-like theme." Cell **112**(6): 737-740.

Hegen, M., J. C. Keith, Jr., M. Collins and C. L. Nickerson-Nutter (2008). "Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **67**(11): 1505-1515.

Heibeck, T. H., S. J. Ding, L. K. Opresko, R. Zhao, A. A. Schepmoes, F. Yang, A. V. Tolmachev, M. E. Monroe, D. G. Camp, R. D. Smith, H. S. Wiley and W. J. Qian (2009). "An extensive survey of tyrosine phosphorylation revealing new sites in human mammary epithelial cells." J Proteome Res **8**(8): 3852-3861.

Hellström, M., M. Kalén, P. Lindahl, A. Abramsson and C. Betsholtz (1999). "Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse." Development **126**(14): 3047-3055.

Hellström, M., L. K. Phng, J. J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A. K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, M. L. Iruela-Arispe, M. Kalén, H. Gerhardt and C. Betsholtz (2007). "Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis." Nature **445**(7129): 776-780.

Hermant, B., S. Bibert, E. Concord, B. Dublet, M. Weidenhaupt, T. Vernet and D. Gulino-Debrac (2003). "Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration." J Biol Chem **278**(16): 14002-14012.

Herren, B., B. Levkau, E. W. Raines and R. Ross (1998). "Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases." Mol Biol Cell **9**(6): 1589-1601.

Hervé, M. A., G. Meduri, F. G. Petit, T. S. Domet, G. Lazennec, S. Mourah and M. Perrot-Applanat (2006). "Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus." J Endocrinol **188**(1): 91-99.

Heuberger, J. and W. Birchmeier (2010). "Interplay of Cadherin-Mediated Cell Adhesion and Canonical Wnt Signaling." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **2**(2).

Hirase, T., J. M. Staddon, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka, M. Itoh, M. Furuse, K. Fujimoto, S. Tsukita and L. L. Rubin (1997). "Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells." J Cell Sci **110 (Pt 14)**: 1603-1613.

Hobbs, S. K., W. L. Monsky, F. Yuan and e. al (1998). "Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(8): 4607-4612.

Hoch, R. V. and P. Soriano (2003). "Roles of PDGF in animal development." Development **130**(20): 4769-4784.

Hocking, D. C., P. G. Phillips, T. J. Ferro and A. Johnson (1990). "Mechanisms of pulmonary edema induced by tumor necrosis factor-alpha." Circ Res **67**(1): 68-77.

Holinstat, M., D. Mehta, T. Kozasa, R. D. Minshall and A. B. Malik (2003). "Protein kinase Calpha-induced p115RhoGEF phosphorylation signals endothelial cytoskeletal rearrangement." J Biol Chem **278**(31): 28793-28798.

Hori, S., S. Ohtsuki, K. Hosoya, E. Nakashima and T. Terasaki (2004). "A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro." J Neurochem **89**(2): 503-513.

Horvath, C. J., T. J. Ferro, G. Jesmok and A. B. Malik (1988). "Recombinant tumor necrosis factor increases pulmonary vascular permeability independent of neutrophils." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 9219-9223.

Houck, K. A., N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li and D. W. Leung (1991). "The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA." Mol Endocrinol **5**(12): 1806-1814.

Houck, K. A., D. W. Leung, A. M. Rowland, J. Winer and N. Ferrara (1992). "Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms." J Biol Chem **267**(36): 26031-26037.

Hu, G., A. T. Place and R. D. Minshall (2008). "Regulation of endothelial permeability by Src kinase signaling: vascular leakage versus transcellular transport of drugs and macromolecules." Chem Biol Interact **171**(2): 177-189.

Hubbard, S. R. and J. H. Till (2000). "Protein tyrosine kinase structure and function." Annu Rev Biochem **69**: 373-398.

Huber, A. H., D. B. Stewart, D. V. Laurents, W. J. Nelson and W. I. Weis (2001). "The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover." J Biol Chem **276**(15): 12301-12309.

Huber, A. H. and W. I. Weis (2001). "The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin." Cell **105**(3): 391-402.

Hudry-Clergeon, H., D. Stengel, E. Ninio and I. Vilgrain (2005). "Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase." FASEB J **19**(6): 512-520.

Hulsmans, H. M., J. W. Jacobs, D. M. van der Heijde, G. A. van Albada-Kuipers, Y. Schenk and J. W. Bijlsma (2000). "The course of radiologic damage during the first six years of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(9): 1927-1940.

Hyder, S. M., Z. Nawaz, C. Chiappetta and G. M. Stancel (2000). "Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor." Cancer Res **60**(12): 3183-3190.

Ichikawa, Y., T. Ishikawa, N. Momiyama, M. Kamiyama, H. Sakurada, R. Matsuyama, S. Hasegawa, T. Chishima, Y. Hamaguchi, S. Fujii, S. Saito, K. Kubota, H. Ike, S. Oki and H. Shimada (2006). "Matrilysin (MMP-7) degrades VE-cadherin and accelerates accumulation of beta-catenin in the nucleus of human umbilical vein endothelial cells." Oncol Rep **15**(2): 311-315.

Imamoto, A. and P. Soriano (1993). "Disruption of the csk gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice." Cell **73**(6): 1117-1124.

Inatome, R., S. Yanagi, T. Takano and H. Yamamura (2001). "A critical role for Syk in endothelial cell proliferation and migration." Biochem Biophys Res Commun **286**(1): 195-199.

Irie, K., K. Shimizu, T. Sakisaka, W. Ikeda and Y. Takai (2004). "Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion." Semin Cell Dev Biol **15**(6): 643-656.

Ishida, A., J. Murray, Y. Saito, C. Kanthou, O. Benzakour, M. Shibuya and E. S. Wijelath (2001). "Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells." Journal of Cellular Physiology **188**(3): 359-368.

Ishikawa, T., Y. Tamai, A. M. Zorn, H. Yoshida, M. F. Seldin, S. Nishikawa and M. M. Taketo (2001). "Mouse Wnt receptor gene Fzd5 is essential for yolk sac and placental angiogenesis." Development **128**(1): 25-33.

Islam, S., T. E. Carey, G. T. Wolf, M. J. Wheelock and K. R. Johnson (1996). "Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion." J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1643-1654.

Ivanov, D., M. Philippova, J. Antropova, F. Gubaeva, O. Iljinskaya, E. Tararak, V. Bochkov, P. Erne, T. Resink and V. Tkachuk (2001). "Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature." Histochem Cell Biol **115**(3): 231-242.

Iyer, S., D. M. Ferreri, N. C. DeCocco, F. L. Minnear and P. A. Vincent (2004). "VE-cadherin-p120 interaction is required for maintenance of endothelial barrier function." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(6): L1143-1153.

Jain, R. K. (2003). "Molecular regulation of vessel maturation." Nat Med **9**(6): 685-693.

Jho, D., D. Mehta, G. Ahmmed, X. P. Gao, C. Tiruppathi, M. Broman and A. B. Malik (2005). "Angiopoietin-1 opposes VEGF-induced increase in endothelial permeability by inhibiting TRPC1-dependent Ca²⁺ influx." Circ Res **96**(12): 1282-1290.

Johnson-Léger, C. A., M. Aurrand-Lions, N. Beltraminelli, N. Fasel and B. A. Imhof (2002). "Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration." Blood **100**(7): 2479-2486.

Kaiser, U. B. (2003). "The pathogenesis of the ovarian hyperstimulation syndrome." N Engl J Med **349**(8): 729-732.

Kaplan, K. B., K. B. Bibbins, J. R. Swedlow, M. Arnaud, D. O. Morgan and H. E. Varmus (1994). "Association of the amino-terminal half of c-Src with focal adhesions alters their properties and is regulated by phosphorylation of tyrosine 527." EMBO J **13**(20): 4745-4756.

Kasum, M. (2010). "New insights in mechanisms for development of ovarian hyperstimulation syndrome." Coll Antropol **34**(3): 1139-1143.

Kataoka, H., J. R. Hamilton, D. D. McKemy, E. Camerer, Y. W. Zheng, A. Cheng, C. Griffin and S. R. Coughlin (2003). "Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells." Blood **102**(9): 3224-3231.

Kazi, A. A. and R. D. Koos (2007). "Estrogen-Induced Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1  , Vascular Endothelial Growth Factor Expression, and Edema in the Uterus Are Mediated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway." Endocrinology **148**(5): 2363-2374.

Kendall, R. L., G. Wang and K. A. Thomas (1996). "Identification of a Natural Soluble Form of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, FLT-1, and Its Heterodimerization with KDR ☆." **226**(2): 324-328.

Khandoga, A., J. S. Kessler, H. Meissner, M. Hanschen, M. Corada, T. Motoike, G. Enders, E. Dejana and F. Krombach (2005). "Junctional adhesion molecule-A deficiency increases hepatic ischemia-reperfusion injury despite reduction of neutrophil transendothelial migration." Blood **106**(2): 725-733.

Kiemer, A. K., N. C. Weber, R. F  rst, N. Bildner, S. Kulhanek-Heinze and A. M. Vollmar (2002). "Inhibition of p38 MAPK activation via induction of MKP-1: atrial natriuretic peptide reduces TNF-  -induced actin polymerization and endothelial permeability." Circ Res **90**(8): 874-881.

Klagsbrun, M., S. Takashima and R. Mamluk (2002). "The role of neuropilin in vascular and tumor biology." Adv Exp Med Biol **515**: 33-48.

Kleiner, D. E. and W. G. Stetler-Stevenson (1994). "Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases." Anal Biochem **218**(2): 325-329.

Knudsen, K. A. and M. J. Wheelock (1992). "Plakoglobin, or an 83-kD homologue distinct from beta-catenin, interacts with E-cadherin and N-cadherin." J Cell Biol **118**(3): 671-679.

Kobayashi, H., Y. Okada, T. Asahina, J. Gotoh and T. Terao (1998). "The kallikrein-kinin system, but not vascular endothelial growth factor, plays a role in the increased vascular permeability associated with ovarian hyperstimulation syndrome." J Mol Endocrinol **20**(3): 363-374.

Krebs, L. T., J. R. Shutter, K. Tanigaki, T. Honjo, K. L. Stark and T. Gridley (2004). "Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants." Genes Dev **18**(20): 2469-2473.

Lamagna, C., P. Meda, G. Mandicourt, J. Brown, R. J. Gilbert, E. Y. Jones, F. Kiefer, P. Ruga, B. A. Imhof and M. Aurrand-Lions (2005). "Dual interaction of JAM-C with JAM-B and alpha(M)beta2 integrin: function in junctional complexes and leukocyte adhesion." Mol Biol Cell **16**(10): 4992-5003.

Lambeng, N., Y. Wallez, C. Rampon, F. Cand, G. Christe, D. Gulino-Debrac, I. Vilgrain and P. Huber (2005). "Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues." Circ Res **96**(3): 384-391.

Lampugnani, M. G., F. Orsenigo, M. C. Gagliani, C. Tacchetti and E. Dejana (2006). "Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments." J Cell Biol **174**(4): 593-604.

Lampugnani, M. G., M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L. P. Ruco and E. Dejana (1992). "A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts." J Cell Biol **118**(6): 1511-1522.

Landgren, E., P. Schiller, Y. Cao and L. Claesson-Welsh (1998). "Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1." Oncogene **16**(3): 359-367.

Lee, J. M., G. Zhai, Q. Liu, E. R. Gonzales, K. Yin, P. Yan, C. Y. Hsu, K. D. Vo and W. Lin (2007). "Vascular permeability precedes spontaneous intracerebral hemorrhage in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." Stroke **38**(12): 3289-3291.

Leslie, J. D., L. Ariza-McNaughton, A. L. Bermange, R. McAdow, S. L. Johnson and J. Lewis (2007). "Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis." Development **134**(5): 839-844.

Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nat Rev Immunol **7**(9): 678-689.

Li, H., X. Shi, J. Liu, C. Hu, X. Zhang, H. Liu, J. Jin, P. Opolon, J. P. Vannier, M. Perricaudet, A. Janin, C. Soria and H. Lu (2010). "The soluble fragment of VE-cadherin inhibits angiogenesis by reducing endothelial cell proliferation and tube capillary formation." Cancer Gene Ther.

Limbourg, F. P., K. Takeshita, F. Radtke, R. T. Bronson, M. T. Chin and J. K. Liao (2005). "Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis." Circulation **111**(14): 1826-1832.

Lindsley, R. C., J. G. Gill, M. Kyba, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2006). "Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm." Development **133**(19): 3787-3796.

Lobov, I. B., R. A. Renard, N. Papadopoulos, N. W. Gale, G. Thurston, G. D. Yancopoulos and S. J. Wiegand (2007). "Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3219-3224.

Lowe, J., J. Araujo, J. Yang, M. Reich, A. Oldendorp, V. Shiu, V. Quarmby, H. Lowman, S. Lien, J. Gaudreault and M. Maia (2007). "Ranibizumab inhibits multiple forms of biologically active vascular endothelial growth factor in vitro and in vivo." Exp Eye Res **85**(4): 425-430.

Luo, Y. and G. L. Radice (2005). "N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis." J Cell Biol **169**(1): 29-34.

Luplertlop, N., D. Misse, D. Bray, V. Deleuze, J. P. Gonzalez, V. Leardkamolkarn, H. Yssel and F. Veas (2006). "Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction." EMBO Rep **7**(11): 1176-1181.

Machold, K. P., T. A. Stamm, G. J. Eberl, V. K. Nell, A. Dunky, M. Uffmann and J. S. Smolen (2002). "Very recent onset arthritis--clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease." J Rheumatol **29**(11): 2278-2287.

Mader, S. S. (2006). The cardiovascular system. Understanding Human Anatomy And Physiology. Mader, The McGraw-Hill Companies: 224-252.

Majno, G. and G. E. Palade (1961). "Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study." J Biophys Biochem Cytol **11**: 571-605.

Majno, G., G. E. Palade and G. I. Schoefl (1961). "Studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study." J Biophys Biochem Cytol **11**: 607-626.

- Makanya, A. N., R. Hlushchuk and V. G. Djonov (2009). "Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling." Angiogenesis **12**(2): 113-123.
- Mamdouh, Z., X. Chen, L. M. Pierini, F. R. Maxfield and W. A. Muller (2003). "Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis." Nature **421**(6924): 748-753.
- Manolopoulos, V. G., J. W. Fenton and P. I. Lekes (1997). "The thrombin receptor in adrenal medullary microvascular endothelial cells is negatively coupled to adenylyl cyclase through a Gi protein." Biochim Biophys Acta **1356**(3): 321-332.
- Martin-Padura, I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, A. Stoppacciaro, L. Ruco, A. Villa, D. Simmons and E. Dejana (1998). "Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration." J Cell Biol **142**(1): 117-127.
- Matsuyoshi, N., K. Toda, Y. Horiguchi, T. Tanaka, S. Nakagawa, M. Takeichi and S. Imamura (1997). "In vivo evidence of the critical role of cadherin-5 in murine vascular integrity." Proc Assoc Am Physicians **109**(4): 362-371.
- McClure, N., D. L. Healy, P. A. Rogers, J. Sullivan, L. Beaton, R. V. Haning, D. T. Connolly and D. M. Robertson (1994). "Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome." Lancet **344**(8917): 235-236.
- McClure, N., J. Leya, E. Radwanska, R. Rawlins and R. V. Haning (1992). "Luteal phase support and severe ovarian hyperstimulation syndrome." Hum Reprod **7**(6): 758-764.
- McDonald, D. M., G. Thurston and P. Baluk (1999). "Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation." Microcirculation **6**(1): 7-22.
- McEver, R. P., J. H. Beckstead, K. L. Moore, L. Marshall-Carlson and D. F. Bainton (1989). "GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies." J Clin Invest **84**(1): 92-99.
- McVerry, B. J. and J. G. Garcia (2004). "Endothelial cell barrier regulation by sphingosine 1-phosphate." J Cell Biochem **92**(6): 1075-1085.
- Mehta, D. and A. B. Malik (2006). "Signaling mechanisms regulating endothelial permeability." Physiol Rev **86**(1): 279-367.
- Meldrum, D. R. (2012). "Preventing severe OHSS has many different facets." Fertil Steril **97**(3): 536-538.
- Michaud, K. and F. Wolfe (2007). "Comorbidities in rheumatoid arthritis." Best Pract Res Clin Rheumatol **21**(5): 885-906.

Miyahara, T., K. Hamanaka, D. S. Weber, D. A. Drake, M. Anghelescu and J. C. Parker (2007). "Phosphoinositide 3-kinase, Src, and Akt modulate acute ventilation-induced vascular permeability increases in mouse lungs." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(1): L11-21.

Miyasaka, M. and T. Tanaka (2004). "Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas." Nat Rev Immunol **4**(5): 360-370.

Monsky, W. L., D. Fukumura, T. Gohongi, M. Ancukiewicz, H. A. Weich, V. P. Torchilin, F. Yuan and R. K. Jain (1999). "Augmentation of transvascular transport of macromolecules and nanoparticles in tumors using vascular endothelial growth factor." Cancer Res **59**(16): 4129-4135.

Montero-Balaguer, M., K. Swirsding, F. Orsenigo, F. Cotelli, M. Mione and E. Dejana (2009). "Stable vascular connections and remodeling require full expression of VE-cadherin in zebrafish embryos." PLoS One **4**(6): e5772.

Moon, R. T., B. Bowerman, M. Boutros and N. Perrimon (2002). "The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin." Science **296**(5573): 1644-1646.

Morita, K., H. Sasaki, K. Furuse, M. Furuse, S. Tsukita and Y. Miyachi (2003). "Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia." Exp Dermatol **12**(3): 289-295.

Morris, A. P., A. Tawil, Z. Berkova, L. Wible, C. W. Smith and S. A. Cunningham (2006). "Junctional Adhesion Molecules (JAMs) are differentially expressed in fibroblasts and co-localize with ZO-1 to adherens-like junctions." Cell Commun Adhes **13**(4): 233-247.

Mukouyama, Y. S., H. P. Gerber, N. Ferrara, C. Gu and D. J. Anderson (2005). "Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback." Development **132**(5): 941-952.

Muller, W. A. (2003). "Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response." Trends Immunol **24**(6): 327-334.

Muller, W. A., S. A. Weigl, X. Deng and D. M. Phillips (1993). "PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes." J Exp Med **178**(2): 449-460.

Nagy, J. A., L. F. Brown, D. R. Senger, N. Lanir, L. Vandewater, A. M. Dvorak and H. F. Dvorak (1989). "PATHOGENESIS OF TUMOR STROMA GENERATION - A CRITICAL ROLE FOR LEAKY BLOOD-VESSELS AND FIBRIN DEPOSITION." Biochimica Et Biophysica Acta **948**(3): 305-326.

Nakajima, M., S. Yuasa, M. Ueno, N. Takakura, H. Koseki and T. Shirasawa (2003). "Abnormal blood vessel development in mice lacking presenilin-1." Mech Dev **120**(6): 657-667.

Nakanishi, H. and Y. Takai (2004). "Roles of nectins in cell adhesion, migration and polarization." Biol Chem **385**(10): 885-892.

Navaratna, D., P. G. McGuire, G. Menicucci and A. Das (2007). "Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes." Diabetes **56**(9): 2380-2387.

Navarro, P., L. Caveda, F. Breviario, I. Mândoteanu, M. G. Lampugnani and E. Dejana (1995). "Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin." J Biol Chem **270**(52): 30965-30972.

Navarro, P., L. Ruco and E. Dejana (1998). "Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization." J Cell Biol **140**(6): 1475-1484.

Nawroth, R., G. Poell, A. Ranft, S. Klop, U. Samulowitz, G. Fachinger, M. Golding, D. T. Shima, U. Deutsch and D. Vestweber (2002). "VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts." EMBO J **21**(18): 4885-4895.

Nishio, K., Y. Suzuki, T. Aoki, K. Suzuki, A. Miyata, N. Sato, K. Naoki, H. Kudo, H. Tsumura, H. Serizawa, S. Morooka, Y. Ishimura, M. Suematsu and K. Yamaguchi (1998). "Differential contribution of various adhesion molecules to leukocyte kinetics in pulmonary microvessels of hyperoxia-exposed rat lungs." Am J Respir Crit Care Med **157**(2): 599-609.

Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse and S. Tsukita (2003). "Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice." J Cell Biol **161**(3): 653-660.

Nottebaum, A. F., G. Cagna, M. Winderlich, A. C. Gamp, R. Linnepe, C. Polaschegg, K. Filippova, R. Lyck, B. Engelhardt, O. Kamenyeva, M. G. Bixel, S. Butz and D. Vestweber (2008). "VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF." J Exp Med **205**(12): 2929-2945.

Nourshargh, S., F. Krombach and E. Dejana (2006). "The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues." J Leukoc Biol **80**(4): 714-718.

Ody, C., S. Jungblut-Ruault, D. Cossali, M. Barnet, M. Aurrand-Lions, B. A. Imhof and T. Matthes (2007). "Junctional adhesion molecule C (JAM-C) distinguishes CD27+ germinal center B lymphocytes from non-germinal center cells and constitutes a new diagnostic tool for B-cell malignancies." Leukemia **21**(6): 1285-1293.

Ogita, H., Y. Rikitake, J. Miyoshi and Y. Takai (2010). "Cell adhesion molecules nectins and associating proteins: Implications for physiology and pathology." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **86**(6): 621-629.

Ogita, H. and Y. Takai (2006). "Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, polarization, movement, and proliferation." IUBMB Life **58**(5-6): 334-343.

Ostermann, G., K. S. Weber, A. Zerneck, A. Schröder and C. Weber (2002). "JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes." Nat Immunol **3**(2): 151-158.

Ozaki, H., K. Ishii, H. Horiuchi, H. Arai, T. Kawamoto, K. Okawa, A. Iwamatsu and T. Kita (1999). "Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells." J Immunol **163**(2): 553-557.

Ozawa, M., H. Baribault and R. Kemler (1989). "The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species." EMBO J **8**(6): 1711-1717.

Ozawa, M. and R. Kemler (1992). "Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex." J Cell Biol **116**(4): 989-996.

Paik, J. H., A. Skoura, S. S. Chae, A. E. Cowan, D. K. Han, R. L. Proia and T. Hla (2004). "Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization." Genes Dev **18**(19): 2392-2403.

Pajusola, K., O. Aprelikova, J. Korhonen, A. Kaipainen, L. Pertovaara, R. Alitalo and K. Alitalo (1992). "FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines." Cancer Res **52**(20): 5738-5743.

Pappenheimer, J. R., E. M. Renkin and L. M. Borrero (1951). "Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability." Am J Physiol **167**(1): 13-46.

Pardanaud, L. and F. Dieterlen-Lièvre (1993). "Emergence of endothelial and hemopoietic cells in the avian embryo." Anat Embryol (Berl) **187**(2): 107-114.

Park, J. E., G. A. Keller and N. Ferrara (1993). "The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF." Mol Biol Cell **4**(12): 1317-1326.

Patan, S., M. J. Alvarez, J. C. Schittny and P. H. Burri (1992). "Intussusceptive microvascular growth: a common alternative to capillary sprouting." Arch Histol Cytol **55 Suppl**: 65-75.

Paul, R., Z. G. Zhang, B. P. Eliceiri, Q. Jiang, A. D. Boccia, R. L. Zhang, M. Chopp and D. A. Cheresh (2001). "Src deficiency or blockade of Src activity in mice provides cerebral protection following stroke." Nat Med **7**(2): 222-227.

Pellicci, G., L. Lanfrancone, F. Grignani, J. McGlade, F. Cavallo, G. Forni, I. Nicoletti, T. Pawson and P. G. Pellicci (1992). "A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction." Cell **70**(1): 93-104.

Peng, X., P. M. Hassoun, S. Sammani, B. J. McVerry, M. J. Burne, H. Rabb, D. Pearce, R. M. Tudor and J. G. Garcia (2004). "Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury." Am J Respir Crit Care Med **169**(11): 1245-1251.

Petersen, S., L. Wang and e. al (2007). "Autocrine TNF α Signaling Renders Human Cancer Cells Susceptible to Smac-Mimetic-Induced Apoptosis." Cancer Cell **12**(5): 445-456.

Pierce, M., C. Wang, M. Stump and A. Kamb (2003). "Overexpression of the beta-catenin binding domain of cadherin selectively kills colorectal cancer cells." Int J Cancer **107**(2): 229-237.

Pincus, T. and T. Sokka (2009). "Laboratory tests to assess patients with rheumatoid arthritis: advantages and limitations." Rheum Dis Clin North Am **35**(4): 731-734, vi-vii.

Pizurki, L., Z. Zhou, K. Glynos, C. Roussos and A. Papapetropoulos (2003). "Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production." Br J Pharmacol **139**(2): 329-336.

Potter, M. D., S. Barbero and D. A. Cheresh (2005). "Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state." J Biol Chem **280**(36): 31906-31912.

Qi, J., J. Wang, O. Romanyuk and C. H. Siu (2006). "Involvement of Src family kinases in N-cadherin phosphorylation and beta-catenin dissociation during transendothelial migration of melanoma cells." Mol Biol Cell **17**(3): 1261-1272.

Reijerkerk, A., G. Kooij, S. M. van der Pol, S. Khazen, C. D. Dijkstra and H. E. de Vries (2006). "Diapedesis of monocytes is associated with MMP-mediated occludin disappearance in brain endothelial cells." FASEB J **20**(14): 2550-2552.

Ribatti, D. and V. Djonov (2012). "Intussusceptive microvascular growth in tumors." **316**(2): 126-131.

Ribatti, D., B. Nico and E. Crivellato (2009). "Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis." Angiogenesis **12**(2): 101-111.

Ridgway, J., G. Zhang, Y. Wu, S. Stawicki, W. C. Liang, Y. Chanthery, J. Kowalski, R. J. Watts, C. Callahan, I. Kasman, M. Singh, M. Chien, C. Tan, J. A. Hongo, F. de Sauvage, G. Plowman and M. Yan (2006). "Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis." Nature **444**(7122): 1083-1087.

Riggleman, B., E. Wieschaus and P. Schedl (1989). "Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a Drosophila segment polarity gene." Genes Dev **3**(1): 96-113.

Risau, W. and I. Flamme (1995). "Vasculogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 73-91.

Risau, W., H. Sariola, H. G. Zerwes, J. Sasse, P. Eklom, R. Kemler and T. Doetschman (1988). "Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies." Development **102**(3): 471-478.

Roberts, W. G. and G. E. Palade (1995). "Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor." J Cell Sci **108 (Pt 6)**: 2369-2379.

Rotundo, R. F., T. M. Curtis, M. D. Shah, B. Gao, A. Mastrangelo, S. E. LaFlamme and T. M. Saba (2002). "TNF-alpha disruption of lung endothelial integrity: reduced integrin mediated adhesion to fibronectin." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(2): L316-329.

Ruhrberg, C., H. Gerhardt, M. Golding, R. Watson, S. Ioannidou, H. Fujisawa, C. Betsholtz and D. T. Shima (2002). "Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis." Genes Dev **16**(20): 2684-2698.

Saitou, M., M. Furuse, H. Sasaki, J. D. Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda and S. Tsukita (2000). "Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands." Mol Biol Cell **11**(12): 4131-4142.

Salliot, C., M. Dougados and L. Gossec (2009). "Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: meta-analyses of randomised placebo-controlled trials." Ann Rheum Dis **68**(1): 25-32.

Sandig, M., E. B. Voura, V. I. Kalnins and C. H. Siu (1997). "Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture." Cell Motil Cytoskeleton **38**(4): 351-364.

Santiago-Schwarz, F., P. Anand, S. Liu and S. E. Carsons (2001). "Dendritic cells (DCs) in rheumatoid arthritis (RA): progenitor cells and soluble factors contained in RA synovial fluid yield a subset of myeloid DCs that preferentially activate Th1 inflammatory-type responses." J Immunol **167**(3): 1758-1768.

Schiff, M. H. (2005). "Lack of response to anakinra in rheumatoid arthritis following failure of tumor necrosis factor alpha blockade: comment on the article by Buch et al." Arthritis Rheum **52**(1): 364-365; author reply 365.

Schmelz, M. and W. W. Franke (1993). "Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting retothelial cells of lymph nodes." Eur J Cell Biol **61**(2): 274-289.

Schmelz, M., R. Moll, C. Kuhn and W. W. Franke (1994). "Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: II. Different types of lymphatic vessels." Differentiation **57**(2): 97-117.

Schneeberger, E. E. and R. D. Lynch (2004). "The tight junction: a multifunctional complex." Am J Physiol Cell Physiol **286**(6): C1213-1228.

Schnittler, H. J., B. Püschel and D. Drenckhahn (1997). "Role of cadherins and plakoglobin in interendothelial adhesion under resting conditions and shear stress." Am J Physiol **273**(5 Pt 2): H2396-2405.

Schubert, W., P. G. Frank, B. Razani, D. S. Park, C. W. Chow and M. P. Lisanti (2001). "Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo." J Biol Chem **276**(52): 48619-48622.

Schulz, B., J. Pruessmeyer, T. Maretzky, A. Ludwig, C. P. Blobel, P. Saftig and K. Reiss (2008). "ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin." Circ Res **102**(10): 1192-1201.

Senger, D. R., S. J. Galli, A. M. Dvorak, C. A. Perruzzi, V. S. Harvey and H. F. Dvorak (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." Science **219**(4587): 983-985.

Senger, D. R., C. A. Perruzzi, J. Feder and H. F. Dvorak (1986). "A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines." Cancer Res **46**(11): 5629-5632.

Shalaby, F., J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.-F. Wu, M. L. Breitman and A. C. Schuh (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." Nature **376**(6535): 62-66.

Shapiro, L., A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Grübel, J. F. Legrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman and W. A. Hendrickson (1995). "Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins." Nature **374**(6520): 327-337.

Shapiro, L. and W. I. Weis (2009). "Structure and biochemistry of cadherins and catenins." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(3): a003053.

Shasby, D. M., D. R. Ries, S. S. Shasby and M. C. Winter (2002). "Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(6): L1330-1338.

Shay-Salit, A., M. Shushy, E. Wolfovitz, H. Yahav, F. Breviario, E. Dejana and N. Resnick (2002). "VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9462-9467.

Shen, L., C. R. Weber, D. R. Raleigh, D. Yu and J. R. Turner (2011). "Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo." Annu Rev Physiol **73**: 283-309.

Shweiki, D., A. Itin, G. Neufeld, H. Gitay-Goren and E. Keshet (1993). "Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis." J Clin Invest **91**(5): 2235-2243.

Sidibé, A., T. Mannic, M. Arboleas, M. Subileau, D. Gulino-Debrac, L. Bouillet, M. Jan, T. Vandhuick, X. Le Loët, O. Vittecoq and I. Vilgrain (2012). "Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: Evidence for tumor necrosis factor α -induced VE-cadherin cleavage." Arthritis Rheum **64**(1): 77-87.

Siekmann, A. F. and N. D. Lawson (2007). "Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries." Nature **445**(7129): 781-784.

Silman, A. J. and J. E. Pearson (2002). "Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S265-272.

Singh, J. A., D. E. Furst, A. Bharat, J. R. Curtis, A. F. Kavanaugh, J. M. Kremer, L. W. Moreland, J. O'Dell, K. L. Winthrop, T. Beukelman, S. L. Bridges, W. W. Chatham, H. E. Paulus, M. Suarez-Almazor, C. Bombardier, M. Dougados, D. Khanna, C. M. King, A. L. Leong, E. L. Matteson, J. T. Schousboe, E. Moynihan, K. S. Kolba, A. Jain, E. R. Volkmann, H. Agrawal, S. Bae, A. S. Mudano, N. M. Patkar and K. G. Saag (2012). "2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis." Arthritis Care Res (Hoboken) **64**(5): 625-639.

Slauson, D. O., F. F. Hahn, S. A. Benjamin, T. L. Chiffelle and R. K. Jones (1976). "Inflammatory sequences in acute pulmonary radiation injury." Am J Pathol **82**(3): 549-572.

Smolen, J. S., J. C. Avila and D. Aletaha (2012). "Tocilizumab inhibits progression of joint damage in rheumatoid arthritis irrespective of its anti-inflammatory effects: disassociation of the link between inflammation and destruction." Ann Rheum Dis **71**(5): 687-693.

Smolen, J. S. and P. E. Lipsky (2002). Targeted Therapies in Rheumatology, Informa Healthcare.

Smolen, J. S. and G. Steiner (2003). "Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis." Nat Rev Drug Discov **2**(6): 473-488.

Sone, H., Y. Kawakami, M. Sakauchi, Y. Nakamura, A. Takahashi, H. Shimano, Y. Okuda, T. Segawa, H. Suzuki and N. Yamada (2001). "Neutralization of vascular endothelial growth factor prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease in mice." Biochem Biophys Res Commun **281**(2): 562-568.

Spring, K., C. Chabot, S. Langlois, L. Lapointe, N. T. Trinh, C. Caron, J. K. Hebda, J. Gavard, M. Elchebly and I. Royal (2012). "Tyrosine phosphorylation of DEP-1/CD148 as a mechanism controlling Src kinase activation, endothelial cell permeability, invasion and capillary formation." Blood.

Staley, K. and H. Scharfman (2005). "A woman's prerogative." Nat Neurosci **8**(6): 697-699.

Stalmans, I., Y. S. Ng, R. Rohan, M. Fruttiger, A. Bouché, A. Yuce, H. Fujisawa, B. Hermans, M. Shani, S. Jansen, D. Hicklin, D. J. Anderson, T. Gardiner, H. P. Hammes, L.

Moons, M. Dewerchin, D. Collen, P. Carmeliet and P. A. D'Amore (2002). "Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms." J Clin Invest **109**(3): 327-336.

Stamatovic, S. M., O. B. Dimitrijevic, R. F. Keep and A. V. Andjelkovic (2006). "Protein kinase Calpha-RhoA cross-talk in CCL2-induced alterations in brain endothelial permeability." J Biol Chem **281**(13): 8379-8388.

Steiner, G., Smolen, Josef (2002). "Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance." Arthritis Research **4**(Suppl 2).

Steiner, G., M. Tohidast-Akrad, G. Witzmann, M. Vesely, A. Studnicka-Benke, A. Gal, M. Kunaver, P. Zenz and J. S. Smolen (1999). "Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis." Rheumatology **38**(3): 202-213.

Stout, R. D. and J. Suttles (1997). "T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease." Front Biosci **2**: d197-206.

Sui, X. F., T. D. Kiser, S. W. Hyun, D. J. Angelini, R. L. Del Vecchio, B. A. Young, J. D. Hasday, L. H. Romer, A. Passaniti, N. K. Tonks and S. E. Goldblum (2005). "Receptor protein tyrosine phosphatase micro regulates the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia." Am J Pathol **166**(4): 1247-1258.

Suri, C., P. F. Jones, S. Patan, S. Bartunkova, P. C. Maisonpierre, S. Davis, T. N. Sato and G. D. Yancopoulos (1996). "Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis." Cell **87**(7): 1171-1180.

Suzuki, S., K. Sano and H. Tanihara (1991). "Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue." Cell Regul **2**(4): 261-270.

Swirski, F. K., M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J. L. Figueiredo, R. H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T. R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder and M. J. Pittet (2009). "Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites." Science **325**(5940): 612-616.

Szekanecz, Z., G. Kerekes, H. Dér, Z. Sándor, Z. Szabó, A. Végvári, E. Simkovics, L. Soós, A. Szentpétery, T. Besenyei, G. Szücs, S. Szántó, L. Tamási, G. Szegedi, Y. Shoenfeld and P. Soltész (2007). "Accelerated atherosclerosis in rheumatoid arthritis." Ann N Y Acad Sci **1108**: 349-358.

Szekanecz, Z. and A. E. Koch (2008). "Vascular involvement in rheumatic diseases: 'vascular rheumatology'." Arthritis Res Ther **10**(5): 224.

Taddei, A., C. Giampietro, A. Conti, F. Orsenigo, F. Breviario, V. Pirazzoli, M. Potente, C. Daly, S. Dimmeler and E. Dejana (2008). "Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5." Nat Cell Biol **10**(8): 923-934.

Takahashi, N., Y. Seko, E. Noiri, K. Tobe, T. Kadowaki, H. Sabe and Y. Yazaki (1999). "Vascular endothelial growth factor induces activation and subcellular translocation of focal adhesion kinase (p125FAK) in cultured rat cardiac myocytes." Circ Res **84**(10): 1194-1202.

Takai, Y., K. Irie, K. Shimizu, T. Sakisaka and W. Ikeda (2003). "Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization." Cancer Sci **94**(8): 655-667.

Tallquist, M. D., W. J. French and P. Soriano (2003). "Additive effects of PDGF receptor beta signaling pathways in vascular smooth muscle cell development." PLoS Biol **1**(2): E52.

Taniguchi, T., T. Kobayashi, J. Kondo, K. Takahashi, H. Nakamura, J. Suzuki, K. Nagai, T. Yamada, S. Nakamura and H. Yamamura (1991). "Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis." J Biol Chem **266**(24): 15790-15796.

Tapper, D., R. Langer, A. R. Bellows and J. Folkman (1979). "Angiogenesis capacity as a diagnostic marker for human eye tumors." Surgery **86**(1): 36-40.

Tenan, M., M. Aurrand-Lions, V. Widmer, A. Alimenti, K. Burkhardt, F. Lazeyras, M. C. Belkouch, P. Hammel, P. R. Walker, M. A. Duchosal, B. A. Imhof and P. Y. Dietrich (2010). "Cooperative expression of junctional adhesion molecule-C and -B supports growth and invasion of glioma." Glia **58**(5): 524-537.

Terman, B. I., M. Dougher-Vermazen, M. E. Carrion, D. Dimitrov, D. C. Armellino, D. Gospodarowicz and P. Böhlen (1992). "Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor." Biochem Biophys Res Commun **187**(3): 1579-1586.

Thoreson, M. A., P. Z. Anastasiadis, J. M. Daniel, R. C. Ireton, M. J. Wheelock, K. R. Johnson, D. K. Hummingbird and A. B. Reynolds (2000). "Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion." J Cell Biol **148**(1): 189-202.

Thèse Mannic, T. (2009, 2009-10-29). "HAL :: [tel-00526108, version 1] VE-cadhérine dans l'inflammation et le cancer: phosphorylation et clivage." from <http://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00526108/>.

Tillet, E., D. Vittet, O. Féraud, R. Moore, R. Kemler and P. Huber (2005). "N-cadherin deficiency impairs pericyte recruitment, and not endothelial differentiation or sprouting, in embryonic stem cell-derived angiogenesis." Exp Cell Res **310**(2): 392-400.

Timmerman, I., M. Hoogenboezem, A. M. Bennett, D. Geerts, P. L. Hordijk and J. D. van Buul (2012). "The tyrosine phosphatase SHP2 regulates recovery of endothelial adherens junctions through control of β -catenin phosphorylation." Mol Biol Cell.

Tiruppathi, C., R. D. Minshall, B. C. Paria, S. M. Vogel and A. B. Malik (2002). "Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability." Vascu Pharmacol **39**(4-5): 173-185.

Tiruppathi, C., T. Naqvi, R. Sandoval, D. Mehta and A. B. Malik (2001). "Synergistic effects of tumor necrosis factor-alpha and thrombin in increasing endothelial permeability." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(4): L958-968.

Torres-Vázquez, J., M. Kamei and B. M. Weinstein (2003). "Molecular distinction between arteries and veins." Cell Tissue Res **314**(1): 43-59.

Turowski, P., R. Martinelli, R. Crawford, D. Wateridge, A. P. Papageorgiou, M. G. Lampugnani, A. C. Gamp, D. Vestweber, P. Adamson, E. Dejana and J. Greenwood (2008). "Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration." J Cell Sci **121**(Pt 1): 29-37.

Tzima, E., M. Irani-Tehrani, W. B. Kiosses, E. Dejana, D. A. Schultz, B. Engelhardt, G. Cao, H. DeLisser and M. A. Schwartz (2005). "A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress." Nature **437**(7057): 426-431.

Ukropec, J. A., M. K. Hollinger, S. M. Salva and M. J. Woolkalis (2000). "SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin." J Biol Chem **275**(8): 5983-5986.

Van De Graaff, K. M. (2001). Circulation system. Human Anatomy - Sixth Edition, McGraw-Hill Science/Engineering/Math: 537-601.

van Groningen, J. P., A. C. Wenink and L. H. Testers (1991). "Myocardial capillaries: increase in number by splitting of existing vessels." Anat Embryol (Berl) **184**(1): 65-70.

Van Itallie, C. M., J. Holmes, A. Bridges, J. L. Gookin, M. R. Coccaro, W. Proctor, O. R. Colegio and J. M. Anderson (2008). "The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2." J Cell Sci **121**(Pt 3): 298-305.

van Meer, G. and K. Simons (1986). "The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells." EMBO J **5**(7): 1455-1464.

Vander, A. S. a. D. L. (2001). Human Physiology: The Mechanisms of Body Function - 8th Edition Download | PDF Free eBooks Download, McGraw-Hill Education.

Venkiteswaran, K., K. Xiao, S. Summers, C. C. Calkins, P. A. Vincent, K. Pumiglia and A. P. Kowalczyk (2002). "Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin." Am J Physiol Cell Physiol **283**(3): C811-821.

VILGRAIN, I. (2007). Angiogenesis In Endocrine Tissues.

Villar, I. C., S. Francis, A. Webb, A. J. Hobbs and A. Ahluwalia (2006). "Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone." Kidney Int **70**(5): 840-853.

Villasante, A., A. Pacheco, E. Pau, A. Ruiz, A. Pellicer and J. A. Garcia-Velasco (2008). "Soluble vascular endothelial-cadherin levels correlate with clinical and biological aspects of severe ovarian hyperstimulation syndrome." Hum Reprod **23**(3): 662-667.

Villasante, A., A. Pacheco, A. Ruiz, A. Pellicer and J. A. Garcia-Velasco (2007). "Vascular endothelial cadherin regulates vascular permeability: Implications for ovarian hyperstimulation syndrome." J Clin Endocrinol Metab **92**(1): 314-321.

Vincent, P. A., K. Xiao, K. M. Buckley and A. P. Kowalczyk (2004). "VE-cadherin: adhesion at arm's length." Am J Physiol Cell Physiol **286**(5): C987-997.

Vinores, S. A. (2006). "Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration." Int J Nanomedicine **1**(3): 263-268.

Vittet, D., T. Buchou, A. Schweitzer, E. Dejana and P. Huber (1997). "Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6273-6278.

Vokes, S., S. Yatskievych and e. al (2004). "Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis." Development **131**(17): 4371-4380.

von Andrian, U. H. and T. R. Mempel (2003). "Homing and cellular traffic in lymph nodes." Nat Rev Immunol **3**(11): 867-878.

Wachtel, M., K. Frei, E. Ehler, A. Fontana, K. Winterhalter and S. M. Gloor (1999). "Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition." J Cell Sci **112** (Pt 23): 4347-4356.

Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.

Wallez, Y., F. Cand, F. Cruzalegui, C. Wernstedt, S. Souchelnytskyi, I. Vilgrain and P. Huber (2007). "Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site." Oncogene **26**(7): 1067-1077.

Wallez, Y. and P. Huber (2008). "Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 794-809.

Wallez, Y., I. Vilgrain and P. Huber (2006). "Angiogenesis: the VE-cadherin switch." Trends Cardiovasc Med **16**(2): 55-59.

Wang, H. U., Z. F. Chen and D. J. Anderson (1998). "Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4." Cell **93**(5): 741-753.

Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." Genes & Development **15**(22): 2922-2933.

Wang, X. and Y. Lin (2008). "Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?*" Acta Pharmacol Sin **29**(11): 1275-1288.

Wang, Y., S. Pampou, K. Fujikawa and L. Varticovski (2004). "Opposing effect of angiopoietin-1 on VEGF-mediated disruption of endothelial cell-cell interactions requires activation of PKC beta." J Cell Physiol **198**(1): 53-61.

Weis, S., S. Shintani, A. Weber, R. Kirchmair, M. Wood, A. Cravens, H. McSharry, A. Iwakura, Y. S. Yoon, N. Himes, D. Burstein, J. Doukas, R. Soll, D. Losordo and D. Cheresch (2004). "Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction." J Clin Invest **113**(6): 885-894.

Weis, S. M. (2008). "Vascular permeability in cardiovascular disease and cancer." Curr Opin Hematol **15**(3): 243-249.

Weis, S. M. and D. A. Cheresch (2005). "Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability." Nature **437**(7058): 497-504.

Weis, W. I. and W. J. Nelson (2006). "Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum." J Biol Chem **281**(47): 35593-35597.

Westphal, J. R., A. M. Boerbooms, C. J. Schalwijk, H. Kwast, M. De Weijert, C. Jacobs, G. Vierwinden, D. J. Ruiter, L. B. Van de Putte and R. M. De Waal (1994). "Anti-endothelial cell antibodies in sera of patients with autoimmune diseases: comparison between ELISA and FACS analysis." Clin Exp Immunol **96**(3): 444-449.

Williams, L. A., I. Martin-Padura, E. Dejana, N. Hogg and D. L. Simmons (1999). "Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM)." Mol Immunol **36**(17): 1175-1188.

Wilting, J., R. Birkenhäger, A. Eichmann, H. Kurz, G. Martiny-Baron, D. Marmé, J. E. McCarthy, B. Christ and H. A. Weich (1996). "VEGF121 induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic vessels of chorioallantoic membrane." Dev Biol **176**(1): 76-85.

Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz, J. Kraus, G. Rascher-Eggstein, S. Liebner, S. Hamm, F. Duffner, E. H. Grote, W. Risau and B. Engelhardt (2003). "Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme." Acta Neuropathol **105**(6): 586-592.

Wong, J., B. Johnston, S. S. Lee, D. C. Bullard, C. W. Smith, A. L. Beaudet and P. Kubes (1997). "A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature." J Clin Invest **99**(11): 2782-2790.

Wooley, P. H., H. S. Luthra, M. M. Griffiths, J. M. Stuart, A. Huse and C. S. David (1985). "Type II collagen-induced arthritis in mice. IV. Variations in immunogenetic regulation provide evidence for multiple arthritogenic epitopes on the collagen molecule." J Immunol **135**(4): 2443-2451.

Wright, M., M. Aikawa, W. Szeto and J. Papkoff (1999). "Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **263**(2): 384-388.

Wu, H. M., Y. Yuan, D. C. Zawieja, J. Tinsley and H. J. Granger (1999). "Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability." Am J Physiol **276**(2 Pt 2): H535-542.

Wu, W. B. and T. F. Huang (2003). "Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis." Exp Cell Res **288**(1): 143-157.

Wójciak-Stothard, B., A. Entwistle, R. Garg and A. J. Ridley (1998). "Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells." J Cell Physiol **176**(1): 150-165.

Wójciak-Stothard, B., S. Potempa, T. Eichholtz and A. J. Ridley (2001). "Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability." J Cell Sci **114**(Pt 7): 1343-1355.

Xavier F. Figueroa, B. R. D., X. F. Figueroa and B. R. Duling (2009). "Gap Junctions in the Control of Vascular Function." Antioxidants & Redox Signaling **11**(2): 251.

Xiao, K., J. Garner, K. M. Buckley, P. A. Vincent, C. M. Chiasson, E. Dejana, V. Faundez and A. P. Kowalczyk (2005). "p120-Catenin Regulates Clathrin-dependent Endocytosis of VE-Cadherin." Molecular Biology of the Cell **16**(11): 5141-5151.

Yamazaki, Y., K. Okawa, T. Yano and S. Tsukita (2008). "Optimized proteomic analysis on gels of cell-cell adhering junctional membrane proteins." Biochemistry **47**(19): 5378-5386.

Yang, J., Y. Lin, Z. Guo, J. Cheng, J. Huang, L. Deng, W. Liao, Z. Chen, Z.-g. Liu and B. Su (2001). "The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-[kappa]B activation." Nat Immunol **2**(7): 620-624.

Yano, K., P. C. Liaw, J. M. Mullington, S. C. Shih, H. Okada, N. Bodyak, P. M. Kang, L. Toltl, B. Belikoff, J. Buras, B. T. Simms, J. P. Mizgerd, P. Carmeliet, S. A. Karumanchi and W. C. Aird (2006). "Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality." J Exp Med **203**(6): 1447-1458.

Yatomi, Y., T. Ohmori, G. Rile, F. Kazama, H. Okamoto, T. Sano, K. Satoh, S. Kume, G. Tigyi, Y. Igarashi and Y. Ozaki (2000). "Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells." Blood **96**(10): 3431-3438.

Yeaman, C., K. K. Grindstaff and W. J. Nelson (2004). "Mechanism of recruiting Sec6/8 (exocyst) complex to the apical junctional complex during polarization of epithelial cells." J Cell Sci **117**(Pt 4): 559-570.

Zanetti, A., M. G. Lampugnani, G. Balconi, F. Breviario, M. Corada, L. Lanfranccone and E. Dejana (2002). "Vascular endothelial growth factor induces SHC association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(4): 617-622.

Zhao, J., P. A. Singleton, M. E. Brown, S. M. Dudek and J. G. Garcia (2009). "Phosphotyrosine protein dynamics in cell membrane rafts of sphingosine-1-phosphate-stimulated human endothelium: role in barrier enhancement." Cell Signal **21**(12): 1945-1960.

Zhao, Y. and H. W. Davis (1998). "Hydrogen peroxide-induced cytoskeletal rearrangement in cultured pulmonary endothelial cells." J Cell Physiol **174**(3): 370-379.

Zhou, A., S. Egginton, O. Hudlická and M. D. Brown (1998). "Internal division of capillaries in rat skeletal muscle in response to chronic vasodilator treatment with alpha1-antagonist prazosin." Cell Tissue Res **293**(2): 293-303.

Zimmermann, R. C., T. Hartman, S. Kavic, S. A. Pauli, P. Bohlen, M. V. Sauer and J. Kitajewski (2003). "Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development." J Clin Invest **112**(5): 659-669.

Résumé:

La fonction de barrière de l'endothélium vasculaire est affectée par des modifications de la cadhérine des cellules endothéliales (VE-cadhérine) telles que la phosphorylation sur tyrosine dans son domaine cytoplasmique et le clivage de son domaine extracellulaire (sVE). Ce travail s'est articulé en deux parties : **1-** Etude de ces modifications dans le contexte de la polyarthrite rhumatoïde (PR), et les mécanismes sous-tendus. Ce travail a permis de montrer que la VE-cadhérine est une cible du $\text{TNF}\alpha$, une cytokine essentielle dans la PR, qui induit de la libération de sVE de façon dépendante de l'activité kinase de Src, suggérant l'implication d'un mécanisme de phosphorylation sur tyrosine dans ce processus. De plus, la VE-cadhérine est aussi la cible des protéases de la matrice extracellulaire telles que MMP-2. L'application de ces données fondamentales à la clinique a permis de montrer que sVE était retrouvée dans le sang de patients PR (n=63) et que son taux était corrélé à l'activité de la maladie. Ainsi, le dosage de sVE est d'intérêt dans la prise en charge des patients. **2-** Etude de la phosphorylation de la VE-cadhérine dans un contexte d'angiogenèse hormono-régulée au cours du cycle ovarien chez la souris. Les résultats ont montré que le site Y685 de la VE-cadhérine est phosphorylé dans l'ovaire et l'utérus de souris de façon régulée pendant le cycle, ce qui permet de proposer ce modèle physiologique pour étudier la phosphorylation de la VE-cadhérine *in vivo*. L'analyse de souris knock-in Y685F de la VE-cadhérine (VE-Y685F) a montré que l'absence du site confère une perméabilité accrue dans l'ovaire et l'utérus mais aussi dans les petits capillaires de la peau. De plus, dans deux modèles d'induction d'arthrite, les souris VE-Y685F ont présenté un taux de sVE plus élevé que les contrôles. Au total, sVE et la phosphorylation de la VE-cadhérine ont un vaste champ d'application dans le traitement de la PR ainsi que pour le développement de nouvelles thérapies pouvant s'étendre à d'autres pathologies vasculaires.

Abstract:

The vascular endothelium barrier function is influenced by vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) modifications such as its cytoplasmic tail tyrosine phosphorylation and its ecto-domain cleavage (sVE). The work reported herein was divided into two parts: **1-** Study of VE-cadherin modifications and the mechanisms underlying these ones in the rheumatoid arthritis context. This work demonstrated that VE-cadherin is a target of $\text{TNF}\alpha$, a highly important cytokine in rheumatoid arthritis (RA) pathogenesis. We found $\text{TNF}\alpha$ to induce sVE shedding in a Src kinase dependent manner, suggesting the involvement of phosphorylation mechanism in this process. In addition, this VE-cadherin cleavage requires matrix metalloproteinase activities such as that of MMP-2. Applying these fundamental data to clinical study showed that sVE was detected in sera of 63 RA patients and its titer was correlated with the disease activity. This finding suggests an obvious interest for assaying sVE in RA therapies. **2-** Study of VE-cadherin tyrosine phosphorylation in a context of hormones-regulated angiogenesis during mouse estrous cycle. The results showed VE-cadherin phosphorylation at Y685 that was regulated along mouse estrous cycle allowing to proposing mouse estrous cycle as a physiological model for studying VE-cadherin phosphorylation *in vivo*. The analysis of VE-cadherin Y685F knock-in mice (VE-Y685F) showed that these mice exhibit a higher vascular permeability in uterus and ovaries and the skin small capillaries compared to wild-type animals. Moreover, VE-Y685F mice presented higher levels of soluble VE-cadherin compared to wild-type counterparts in two induced arthritis model. Altogether, sVE and VE-cadherin phosphorylation present an array of interests for RA therapies as well as developing new therapeutic tools in RA and other vascular diseases.